

Suomalaisten kämmeköiden endofyyttiset sienet.

Henri Vanhanen^{1,2)}, Outi Kaltiainen²⁾ & Riikka Linnakoski^{2,3)}

¹⁾MTT - Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus, Sotkamon tutkimusasema, Kipinäntie 16, 88600 Sotkamo, henri.vanhanen@mtt.fi

²⁾Itä-Suomen yliopisto, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta, Metsätieteiden osasto, Yliopistokatu 7, 80101 Joensuu

³⁾Biodiversiteetti ja ympäristötieteen osasto, Biologian laitos, 20014 Turun yliopisto, riikka.linnakoski@utu.fi

Viime vuosikymmeninä kehittyneet lisäysmenetelmät ovat tuoneet trooppisten kämmeköiden lisäksi myös lauhkean vyöhykkeen terrestrisiä kämmeköitä puutarhakauppojen valikoimiin. Kämmekät itävät ja elävät symbionttisten sientensä avulla ts. ovat joko kokonaan tai osittain mykoheterotrofisia, mutta kaupalliseen tuotantoon suunnatut lisäysmenetelmät perustuvat täysin asymbioottisiin eli ilman sieniosakasta ylläpidettäviin *in vitro* –viljelmiin.

Endofyyttisten sienten merkitystä kämmeköiden puutarhatuotannossa ei ole tutkittu riittävästi. Lajistosta tai sen maantieteellisestä vaihtelevuudesta ei ole kattavaa tietoutta vaikka endofyyttisillä sienillä voi olla suuri merkitys kestävien puutarhakantojen luomiseksi. Osaa lajeista ei edes kyetä lisäämään ilman sen sieniosakasta. Endofyyttiset sienet voivat edistää kasvinterveyttä, kasvua ja auttaa kasvia kestämaan paremmin ympäristön aiheuttamaa stressiä, kuten kuivuutta.

Eristimme valkolehdokilla (*Platanthera bifolia*) ja lehtoneidonvaipalla (*Epipactis helleborine*) eläviä endofyyttisiä sieniä selvittääksemme suomalaisten kämmeköiden endofyyttilajistoa. Tutkimuslajeista eristetyistä viljelmistä tunnistettiin kolme eri endofyyttistä sientä: *Trichoderma hamatum*, *Penicillium purporogenum* ja *Mortierella* sp. Lajistotietämyksellä ja endofyyttisten sienten viljelyyn ottamisella voi olla suurta merkitystä luotaessa kotimaisiin luonnonkantoihin perustuvaa kämmeköiden puutarhatuotantoa.

Asiasanat: Kämmekä, endofyytti, valkolehdokki, lehtoneidonvaippa, mykoheterotrofia, *Trichoderma hamatum*, *Penicillium purporogenum* ja *Mortierella* sp.

Johdanto

Terrestristen kämmeköiden kaupallisesta viljelystä tekee hankalan niiden symbionttisuhde sieniosakkaan kanssa sekä kämmeköiden hidas kasvu kukkiviksi yksilöiksi (Pritchard 1989, Arditti & Krikorian 1996, Yam ym. 2002, Rasmussen 2008). Luonnossa kämmekät ovat täysin riippuvaisia niiden sieniosakkaastaan itämisen ja maanalaisen taimivaiheen ajan. Kämmekät ovat mykoheterofisia kunnes ne kasvattavat ensimmäiset lehtivihreälliset lehtensä. Osa kämmekkälajeista on taasen täysin tai osittain mykoheterotrofisia koko elonsa ajan.

Yksittäiset kämmekkälajit kykenevät käyttämään symbionttisina sieninään useita eri lajeja, joilla voi olla eri tehtäviä. Osa sienistä käynnistää itämisen, osa toimii antagonisteina taudinaiheuttajia vastaan ja osa auttaa veden ja ravinteiden otossa. Kämmeköiden käyttämää endofyyttilajistoa ei ole tutkittu Suomessa. Kehittyneistä *in vitro* -menetelmistä huolimatta ei joitakin kämmekkälajeja ole kyetty kasvattamaan ilman niiden symbionttisia sieniä tai niiden itäminen ilman sientä on ollut hyvin heikkoa (Masuhara & Katsuya 1989). Tässä tutkimuksessa eristimme endofyyttisiä sieniä sekä valkolehdokilta (*Platanthera bifolia*) että lehtoneidonvaipalta (*Epipactis helleborine*). Sienten eristämisen ja tunnistamisen jälkeen ne ovat käytettävissä jatkotutkimuksiin joissa voidaan testata niiden soveltuvuutta kämmeköiden kasvatuksessa.

Aineisto ja menetelmät

Näytteiden keruu ja endofyyttisten sienten eristäminen

Kasvinäytteet valkolehdokilta ja lehtoneidonvaipalta kerättiin Etelä-Karjalasta, Lappeenrannasta maanomistajan, Lappeenrannan kaupungin ja ympäristöviranomaisen, Etelä-Karjalan ELY-keskuksen myöntämin luvuin.

Endofyyttiset sienet eristettiin kasveilta "single peloton"-menetelmällä, joka on kuvattu tarkemmin ja yksityiskohtaisemmin Zhun ym. (2008) artikkelissa. Menetelmässä valitaan mikroskooppiseen tarkasteluun perustuen juuren osia joissa pelotonit eli sienirihmastokerät sijaitsevat. Seuraavaksi juuri tai siitä irrotettu exo- tai endodermis sterilisoidaan streptomysiiniä ja bentsyylipenisilliiniä käsittelyin sisältävässä steriilissä vedessä. Sterilisointi toistetaan useasti vaiheiden edetessä. Sterilisoinnin jälkeen valitut yksittäiset pelotonit asetetaan inkuboitavaksi steriiliin veteen, jossa on streptomysiiniä ja bentsyylipenisilliiniä. Käsittelyllä pyritään kiihdyttämään sienirihmaston kasvua ulos pelotonista (Kuva 1.). Inkuboinnin jälkeen ne pelotonit, joissa on havaittavissa sienirihmaston kasvua, siirretään PDA-alustoille puhdasviljelmien aikaansaamista varten. Tämän jälkeen puhdasviljelmistä voidaan tehdä DNA:n eristys lajin määrittystä varten.

Kuva 1. Lehtoneidonvaipalta eristetty peloton ja siitä ulos kasvavaa sienirihmasto steriilissä vedessä



DNA eristäminen, PCR ja sekvensointi

Sienistä tehdyt puhdasviljelmät jaettiin morfologiansa perusteella ryhmiin ja jokaisesta ryhmästä valittiin yksi sienikanta DNA:n eristykseen. Näytteet tunnistettiin tekemällä PCR ja sekvensoimalla ribosomaalisen DNA:n ITS-alueita (ITS 1, 5.8S & ITS2).

Tulokset ja tulosten tarkastelu

Kasvinäytteistä eristetyistä pelotoneista tunnistettiin kolme eri endofyyttistä sienilajia. Lajien esiintyminen endofyyttisinä tutkituilla kasvilajeilla osoittaa niillä olevan vuorovaikutussuhde kasvien kanssa. Kaksi endofyyttisistä lajeista kyettiin tunnistamaan lajitasolle ja yksi lajeista sukutasolle. Valkolehdokilta eristettiin *Trichoderma hamatum* ja *Mortierella* sp. lajit ja lehtoneidonvaipalta *Penicillium purporogenum* ja *Mortierella* sp. Kaikki eristetyt lajit ovat maaperässä yleisesti esiintyviä sienilajeja joilla on todettu olevan vuorovaikutussuhteita useiden eri kasvilajien kanssa.

Valkolehdokilta eristetty *T. hamatum* on tunnettu antagonistiksi usealle eri sienilajille. Tämän lisäksi sen on havaittu edistävän kasvinterveyttä sekä parantamalla kasvien vedenottoa ja näin ollen viivästyttämällä kuivuuden aiheuttaman stressin ilmentymistä että edistämällä kasvin kasvua (Bae ym. 2009). *T. hamatum* on löydetty endofyyttisenä myös Australialaiselta kämmekkälajilta *Dipodium variegatum* (Bourgoure & Dearnaley 2005).

Lehtoneidonvaipalta eristetty *P. purporogenum* tunnetaan kasvipatogeeninä, mutta sen on toisaalta havaittu toimivan antagonistisena muita kasvien taudinaiheuttajia vastaan, näin ollen edistäen kasvinterveyttä (Larena & Melgarejo 1996). Laji on löydetty endofyyttisenä neidonhiuspuulta (*Ginkgo biloba*) (Qiu *et al.* 2010) ja monilta muilta kasvilajeilta (Bhagobaty & Joshi 2011).

Mortierella suvun sienilajit esiintyvät yleisinä maaperässä ja maailmalta tunnetaan seitsemänkymmentä suvun eri edustajaa. Suvun lajien tiedetään esiintyvän endofyyttisinä kämmeköillä (Ochora ym. 2001, Bidartondo ym. 2004, Jiang ym. 2011) ja niiden on havaittu kykenevän käynnistämään kämmekän siementen itäminen (Ochora *et al.* 2001).

Johtopäätökset

Löydöksemme ovat linjassa jo aiemmin muissa tutkimuksissa tehtyjen havaintojen kanssa. Tutkimuksemme lisäsi tietoutta sekä suomalaisten kämmeköiden ekologiasta että myös antoi viitteitä kämmekän taimikasvatuksen tukena mahdollisesti hyödynnettävistä sienilajeista. Luonnon-oloissa maaperän sienilajiston on havaittu olevan kämmeköiden esiintymistä rajoittava tekijä (Bayman ym. 1997). Tällä tekijällä voi olla myös merkitystä kämmeköiden menestymiselle puutarhaoloissa. Sienillä tehtävillä jatkotutkimuksilla tullaan selvittämään sienien mahdollinen rooli kasvin ja sienien välisessä vuorovaikutussuhteessa.

Tunnetun kasvipatogeenin esiintyminen endofyyttisenä lehtoneidonvaipalla herättää kysymyksiä kasvien kansainvälisenkaupan riskeistä. Koska kämmeköillä voi olla tiiviitä assosiaatioita kasvien taudinaiheuttajien kanssa, voi Suomen ulkopuolelta tuotu taimimateriaali aiheuttaa kasviterveysriskin. Taimimateriaalin mukana voi kulkeutua uusia taudinaiheuttajia tai jo esiintyvien taudinaiheuttajien erilaisia virulentimpia kantoja.

Kiitokset

Tahdomme kiittää Nikolai & Ljudmila Borisoff puutarhasäätiötä tämän tutkimuksen taloudellisesta tuesta. Lisäksi tahdomme kiittää Lappeenrannan kaupunkia ja Etelä-Karjalan ELY-keskusta jotka myönsivät luvat kasvinäytteenottoa varten.

Kirjallisuus

- Arditti, J. & Krikorian, A.** 1996. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society* 122: 183–241.
- Bae, H., Sicher, R., Kim, M., Kim, S-H., Strem, M., Melnick, R. & Bailey, B.** 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany* 60(11):3279–3295.
- Bayman, P., Lebrón, L., Tremblay, R. & Lodge, D.** 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist* 135: 143-149.
- Bhagobaty, R.K. & Joshi, S.R.** 2011. Multi-loci Molecular Characterisation of Endophytic Fungi Isolated from Five Medicinal Plants of Meghalaya, India. *Mycobiology* 39(2) : 71-78.
- Bidartondo, M., Burghardt, B., Gebauer, G, Bruns, T. & Read, D.** 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271: 1799–1806.
- Bourgoure, J. & Dearnaley, J.** 2005. The fungal endophytes of *Dipodium variegatum* (Orchidaceae). *Australasian Mycologist* 24:15-19.
- Chet, I. & Harman, G. & Baker, R.** 1981. *Trichoderma hamatum*: Its Hyphal Interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium spp.* *Microbial Ecology* 7(1): 29-38.
- Jiang, W., Yang, G., Zhang, C. & Fu, C.** 2011. Species composition and molecular analysis of symbiotic fungi in roots of *Changnienia amoena* (Orchidaceae). *African Journal of Microbiology Research* 5(3): 222-228.
- Larena I. & Melgarejo P.** 1996. Biological Control of *Monilinia laxa* and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* by a Lytic Enzyme- Producing *Penicillium purpurogenum*. *Biological Control* 6(3):361-367.
- Masuhara, G. & Katsuya, K.** 1989. Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial orchids. *Scientia Horticulturae* 37: 331-337.
- Ochora, J., Stock, W., Linder, H. & Newton, L.** 2001. Symbiotic Seed Germination in Twelve Kenyan Orchid Species. *Systematics and Geography of Plants* 71(2): 585-596.
- Pritchard, H.W.** 1989. *Modern Methods in Orchid Conservation*. Cambridge University Press 184s.
- Qiu, M., Xie, R., Shi, Y., Chen, H., Wen, Y., Gao, Y. & Hu, X.** 2010. Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(6):993-998.
- Rasmussen, H.** 2008. *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant* Cambridge University Press, 460s.
- Yam, T., Nair, H., Hew, C. & Ardiitti, J.** 2002. *Orchid Seeds and their Germination: An Historical Account*. Teoksessa: Kull, T. & Ardiitti, J. (toim.) 2002. *Orchid Biology: Reviews and perspectives*. Kluwer academic Publishers.
- Zhu, G.S., Yu, Z.N., Gui, Y. and Liu, Z.Y.** 2008. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Diversity* 33: 123-137.