

Tartu Ülikool

Loodus- ja tehnoloogiateaduskond

Ökoloogia ja Maateaduste Instituut

Mükoloogia õppetool

Hannes Sirkel

PÕLDTIMUTI (PHLEUM PRATENSE L.) ENDOFÜÜDID

JA FUNGITSIIDIDE TOIME NEILE

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Bellis Kullman

Leho Tedersoo

Tartu 2014

Sisukord

Mõisteid.....	2
1. Sissejuhatus	3
1.1. Taim-endofüüt suhted.....	6
1.2. Põldtimut ja tema endofüüdid	7
1.3. Endofüüdid agrokemikaalide alternatiivina.....	8
2. Materjal ja metoodika.....	10
2.1. Fungitsiidide valimine	10
2.2. Katse aeg ja koht	11
2.3. Endofüütide olemasolu kindlakstegemine taimes mikroskopeerimise abil.....	12
2.4. Timutitaimede töötlemine fungitsiididega.....	13
2.5. Endofüütide isoleerimine puhaskultuuri.....	13
2.6. Puhaskultuuride mikroskopeerimine ja morfoloogiline analüüs	14
2.7. DNA eraldamine ja amplifitseerimine.....	14
2.8. Geelelektroforees.....	15
2.9. Sekventsidega töötamine	15
3. Tulemused	16
3.1. Puhaskultuurist määratud endofüüdid	16
3.1.1. Molekulaarset meetoditega määratud liigid	16
3.1.2. Puhaskultuuri morfoloogiliste tunnuste alusel määratud liigid	17
3.2. Fungitsiidide toime endofüütidele kolmes erinevas kasvukohas	18
3.3. Antagonismi ilmingud samas taimes/katseruudud kasvavate endofüütide vahel.....	19
4. Arutelu.....	20
Kokkuvõte	22
Summary	23
Tänuavaldused.....	24
Kasutatud kirjandus	25
LISAD	29

Mõisteid

endofüüdid – taimedes elavad mikroorganismid, tavaliselt seened või bakterid, kes ei põhjusta taimel nähtavaid haigussümptome.

horisontaalne levik – taimedega seotud seente leviku moodus, mille korral taimega seonduv seen kandub ühelt taimelt teisele eoste, koniidide või hüüfitükikestega tuule või putukvektorite abil.

hüüf (seeneniit) – seentele iseloomulik niitjas tipmiselt kasvav rakk.

ITS – sisemine transkribeeritav speisser (internal transcribed spacer ingl k.). ITS järjestusele vastavat DNA järjestust kasutatakse laialdaselt seeneliikide määramisel.

koniid – seentel koniidikandjatel tekkiv iseseisva liikumisvõimeta mittesuguline eos.

teleomorf – seene sugulise paljunemise arengujärk, mille käigus tekivad meiospoorid.

kontaktne fungitsiid – fungitsiid, mille mõjuala piirneb taime pinnaga, moodustades taimel peale töötlemist haigustekitajate vastu kaitsva pinnakihi.

kosmopoliitne – ülemaailmne, ülemaailmse levikuga.

MALDI-TOF – lühend ingl k.: **m**atrix-**a**ssisted **l**aser **d**esorption/**i**onization **t**ime of **f**light. Mass-spektromeetri tüüp.

patogeen – haigustekitaja, ehk mikroorganism, kes kutsub taim- või loomorganismis esile haigusi.

rDNA– ribosomaalne DNA on DNA järjestus, mis kodeerib ribosomaalset RNA-d.

süsteemne fungitsiid – fungitsiid, mille mõjuala on terve taimekoe piires sarnanedes niimoodi antibiootikumidele.

vertikaalne levik – leviku tüüp, mille korral kandub taimega sümbioosis olev mikroorganism ühelt taimelt teisele läbi taime seemnete vanemalt järglastele.

1. Sissejuhatus

Viimasel paaril-kolmel aastakümnetel on hakatud intensiivsemalt tähelepanu pöörata taimedega vastastikku kasulikes suhetes olevatele endosümbiontsetele mikroorganismidele, ehk endofüütidele ja võimalustele nende kasutamisel põllumajanduses. On näidatud, et endofüüdid võivad suurendada taimede vastupanu ebasoodsate keskkonnatingimuste suhtes, vähendada herbivooriat ning pakkuda ka kaitset patogeenide eest (Arnold et al, 2003; Rodriguez et al, 2009). Kuna on avastatud, et paljud taimed kannavad endas neile kasulikke endosümbionte siis nähakse neis alternatiivi agrokemikaalidele (Zhang, 2006). Kuna on näidatud, et mitmed agrokemikaalid on toksilised nii imetajatele, taimedele ja ka teistele organismidele siis nähakse agrokemikaalide asendamisel endofüütidega ka potentsiaali keskkonnasõbralikuma taimekasvatuse loomiseks. Kuigi endofüüte on kirjeldanud juba 1863. aastal Heinrich Anton de Bary (Arnold & Lewis, 2005) on neid hakatud rohkem uurima alles 1980ndate keskpaigast (Zabalgogezcoa, 2008). Tõuke endofüütide intensiivsemaks uurimiseks andis avastus (1977), et kariloomadel mürgistusjuhte põhjustanud söödataimede toksilisus ei tulene mitte taimest endast (roog-aruhein, *Festuca arundinacea*), vaid taimes elavatest endofüütsetest seentest (*Neotyphodium coenophialum*) (Zabalgogezcoa, 2008). Edasi leiti, et toksiliste endofüütsete seente söödataimedest eemaldamine muutis söödataimed kariloomadele küll mitte enam mürgistusjuhte põhjustavaks, kuid samas ka vastuvõtlikumaks taimekahjuritest putukatele (Popay&Hume, 2013). Sellest järeldati, et endofüüdid on taimede mutualistlikud endosümbiondid, pakkudes oma toksiliste metaboliitidega taimedele kaitset herbivooride eest ning saades taimelt vastu enda eluks vajalikke toitaineid ning ka keskkonnamõjude eest kaitstuma elukeskkonna (Rodriguez et al, 2009). Endofüütide vähese uurituse põhjuseks suhteliselt pika, ligikaudu 150 aastase perioodi jooksul alates ajast, mil de Bary neid kirjeldas, on ilmselt nende krüptiline eluviis ja väiksus.

Varasemate, endofüüte kui ainult taimedele kasulikke mutualiste käsitlevate tööde põhjal on kirjanduses levinud ka mõiste endofüüt kasutamine sünonüümsena mutualistiga (Saikkonen et al, 1998). Viimasel ajal seoses endofüütidega seonduvate uurimustööde arvu kasvu ja endofüütidest rohkem teadasaamisega on selgunud, et endofüüdid võivad taimele olla ka

neutraalseteks kaaslasteks või isegi parasiitsete omadustega (Saikkonen et al, 1998). Seetõttu on tekkinud hüpotees taim-endofüüt suhtest kui taime ja endofüüdi vahelisest taskaalustatud antagonismist, kus suhte iseloomu määravad keskkonnafaktorid, taime vanus ja füsioloogiline seisund. (Kogel et al, 2006; Saikkonen et al, 1998)

Kirjandusest võib et leida, et endofüüdi kui mõiste definitsioonid on erinevatel autoritel varieeruvad. Kuna on avastatud, et paljud taimedest isoleeritud ja endofüütidena määratletud seened on ühtlasi ka taimepatogeeneid, kes on taimedest isoleerimise ajal olnud latentse faasis põhjustamata taimel nähtavaid sümptome siis on see tekitanud küsimusi et mida nimetada tegelikult endofüüdiks ja mida mitte.

Esmase, De Bary definitsiooni järgi on endofüüt lihtsalt (mikro)organism, kes elab taimes sees (kreeka k. *ἔνδον* "sees" + *φυτόν* "taim") (Selvanathan et al, 2011). Mõned autorid on nimetanud endofüütideks ka mükorriisseid seeni (Kumar et al, 2013). Üldiselt on vihjatud, et endofüüte kirjeldavates töödes võiks seda mõistet defineerida, et hoiduda erinevate autorite poolt kasutatud erinevate definitsioonide tõttu tekkida võivat ebaselgust. Siin töös defineeritakse endofüüdid kui mikroorganismid, tavaliselt seened või bakterid, kes elavad taimekudes rakkude sees või vahel põhjustamata taimel nähtavaid haigusnähtavaid sümptome (Rodriguez et al., 2009; Hyde & Soyong, 2008; Schulz & Boyle, 2005). Sinna alla kuuluvad ka latentse faasis olevad patogeeneid ja saprotroofid. Mükorriissed seened ei sobi selle definitsiooni alla, kuna nad omavad taimeväliseid struktuure.

Endosümbiootilised suhted taimede ja mikroorganismide vahel on päritolult iidseid ja looduses väga laialt levinud. Fossiilsete andmete põhjal on teada, et suhted endosümbiontsete seente ja taimede vahel olid olemas juba alates esimeste maismaataimede tekkimisest (Krings et al. 2007), omades seetõttu ka pikka ja olulist rolli maismaataimede evolutsioonil. Arvatakse isegi et vastastikku kasulikud suhted varajaste taimede ja seente vahel aitasid taimedel koloniseerida maismaad, ehk tulla evolutsiooni käigus veest kuivale maale (Krings 2007; Krings et al, 2012). Lisaks mutualistlikele suhetele endosümbiontidest seentega võivad taimed olla seotud ka endosümbiontsete bakterite (Mano and Morisaki 2008; Taghavi et al. 2009) ja teiste mikroorganismidega (Rodriguez et al. 2009; Correa et al. 1994; Trémouillaux-Guillermo et al. 2002; Okamoto et al. 2003).

Endofüütseid seeneliike on arvatavalt rohkem kui miljoni (Dreyfuss & Chapela, 1994), kuid hinnanguliselt on praeguseks nendest teada vähem kui 1% (Bidartondo et al. 2011). Samuti on

väga vähe teada endofüütsetest bakteritest, kuid uurimustööd viitavad, et taksonoomiliselt ja funktsionaalselt on nad vähemalt sama mitmekesine rühm kui endofüütsed seened ().

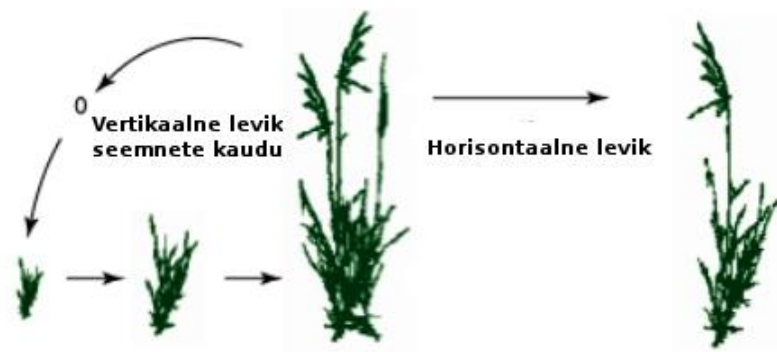
Uued ja järjest juurde tulevad uuringud näitavad, et looduslikes ökosüsteemides on tõenäoliselt enamik, kui mitte kõik taimed sümbiootilistes suhetes endofüütsete mikroorganismidega (Rodriguez et al 2009; Partida-Martínez & Heil 2011). Taimeliike, millel poleks endofüüte, pole teada ning ilma endofüütideta üksiktaimed on haruldased (Zabalgogeo, 2008).

Endofüütide liigiline mitmekesisus kasvab liikudes Maa poolustest ekvaatori suunas ja võib ühe taime piires olla küllaltki suur – näiteks troopilistelt puudelt on leitud ühest lehest üle 20 liigi endofüüte (Arnold et al, 2003) On liike, kes koloniseerivad suhteliselt vabalt mitmeid taimeliike (nt *Epicoccum nigrum*), aga ka selliseid, keda võib leida ainult ühelt teatud taimeliigilt (liigispetsiifilised).

Endofüütide taimelt taimele edasikandumisel eristatakse horisontaalset levikut (ühelt taimelt teisele läbi väliskeskkonna) ja vertikaalselt levikut (vanemalt järglastele, koos taime seemnetega).

Horisontaalse levikuga endofüütsed seened omavad oma elutsükli sugulise paljunemise staadiumi ja levivad eostega ühelt taimelt teisele näiteks tuule või putukvektorite abil. Selline levimismoodus on omane patogeensetele seentele, mis viitab horisontaalse levikuga endofüütide võimalikule sugulusele patogeensete seentega.

Vertikaalse levikuga endofüütsed seened on asekuaalne: nad ei moodusta viljakeha ega spore, vaid kanduvad edasi seene hüüfidega, mis on tunginud peremeestaime seemnetesse. Kuna nii levivate seente reproduktiivsus on tihedalt seotud peremeestaime reproduktiivsusega, on nad üldjuhul taimedega mutualistlikes suhetes. Taimseemnetega (vertikaalselt) levivad endofüüdid üldiselt nakatavad taimi süsteemselt (kogu taime piires), horisontaalselt edasikanduvate endofüütide nakkused jäävad tihti ainult taime mingi osa piirsesse - kujuneb lokaalne nakkus.

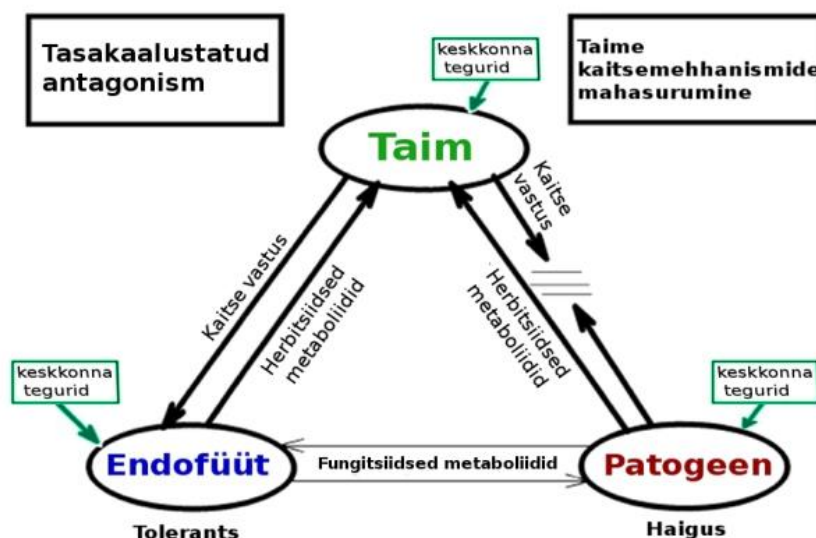


Joonis1. Endofüütsete seente levikuviisid.

Skeem (Joonis 1) näitab endofüüdi horisontaalsest ja vertikaalsest edasikandumisest. Endofüütsete seente korral peavad nad elama vähemalt osa oma elutsüklil taimes põhjustamata seal nähtavaid haigussümptomeid. (Saikkonen et al, 2004, modifitseeritud)

1.1. Taim-endofüüt suhted

Fossiilsete andmete põhjal on leitud, et seened on olnud taimedega mutualistlikes suhetes juba esimeste maismaataimede tekkimisest alates, so ca 400 milj. aastat tagasi, aidates ilmselt taimedel koloniseerida maismaad (Kring et al. 2007). Pole täpselt teada kuidas seened taimede endosümbiontideks said, kuid ilmselt on algselt taimedele patogeensed seened kaotanud oma virulentsuse taimede suhtes ja taimedega koevolutiooni käigus on mõnedest neist saanud peremeestaimest sõltuvad obligaatset mutualistid (*Neotyphodium sp.*). On näidatud, et isegi ainult ühe mutatsiooni tõttu mõnes geenilookuses võib patogeenne organism kaotada oma patogeensed omadused muutudes taimes suhtes neutraalseks (Mostert et al, 2000) Tihti on arvatud, et endofüüdid on taimedele ainult kasulikud (Faeth et al, 2003). Mitmed uuringud on näidanud aga, et taim-endofüüt suhet võiks kirjeldada kui tasakaalustatud antagonismi (Kogel et al, 2006; Saikkonen et al, 1998), kus sümbioosi iseloomu määravad mitmed keskkonnast ja taimes füsioloogilisest seisundist sõltuvad tegurid (toitainete olemasolu, taimes vanus). Endofüüte ja taimi võib vaadelda kui ühte fenotüübilist ühikut (Saikkonen et al, 2004).



Joonis 2. Taim ja endofüütse seene vahelise tasakaalustatud antagonismihüpoteesi skeem (Rommert et al, 1999 modifitseeritud).

Ilmselt kõige paremini uuritud endofüütide kasulik toime taimedele on võime pakkuda kaitset patogeensete organismide eest ja vähendada nii imetajate kui putukate poolset herbivooriat. On leitud, et taimi herbivooria eest kaitsevad endofüüdid (näiteks *Neotyphodium spp.*) toodavad herbivooridele toksilisi ühendeid, millest tuntumad on tungalteraalkaloidid (Betina 1984; Rutschmann & Stadler 1978; Rowan 1986). Kuna kõik tungalteraalkaloidid ei ole kahjulikud imetajatele, vaid mingi osa neist mõjub ainult teatud putukarühmadele siis on saanud võimalikuks aretuse ja selektsiooni tulemusel luua sellised endofüüte sisaldavad heintaimed, mis on vastuvõetavad kariloomadele, kuid mitte kahjurputukatele või teistele patogeenidele (Faville et al, 2007). Teiste patogeensete organismide suhtes (seente, bakterite) võivad nad pakkuda kaitset lisaks antibiootiliste metaboliitide tootmisele ka lihtsalt kasvukeskkonna hõlmamisega taimes, mille tõttu väheneb võimalus patogeeni sisenemiseks taimesse (Bittleston et al, 2011).

1.2. Põldtimut ja tema endofüüdid

Põldtimut (*Phleum pratense*) on kõrreliste (*Poaceae*) sugukonda kuuluv parasvöötmelises kliimas laialt levinud mitmeaastane rohttaim. Lisaks looduslikule levikule kasvatatakse teda ka palju kultuurtaimena, leides kasutust loomade nii haljassöödana, silona kui ka kuiva heinana. On näidatud, et paljud levinud põllumajanduslikult tähtsad sööda ja heintaimed (*Festuca sp.*,

Lolium sp.) kannavad endas endofüütseid seeni (Flecher 1986; Schardl 2009), samuti leidub neid põldtimutis, kuid tema endofüütsete liikide koosseisu ja mitmekesisust on hoolimata timuti laialdasest levikust siiani veel vähe uuritud (Varvas et al 2013). On näidatud, et põldtimuti endofüütne seen tõlvõvik (*Epichloë typhina*), võib anda timutitaimedele kaitse patogeense seene *Cladosporium phlei* vastu (Shimanuki 1987). Timutiga seotuid organisme on teadaolevalt 100 ringis, millest mõned võivad olla timutile kasulikeks endofüütideks omades ka tähtsust põllumajanduses.

1.3. Endofüüdid agrokemikaalide alternatiivina

Nagu eelpool mainitud, nähakse endofüütides potentsiaalset alternatiivi agrokemikaalidele, kuna on näidatud, et nad suurendavad taimede vastupanu mitmete biotilistele ja abiotilistele stressorite suhtes, vähendavad veetarvet ja nendega nakatunud taimed võivad omada võrreldes mittenakatunud taimedega suuremat biomassi. (Singh et al 2011; Arnold et al. 2011; Rodriguez et al. 2008; Aschehoug et al. 2012). Endofüütide poolt taimedel pakutava kasu hulka kuuluvad veel võime pakkuda taimedele kaitset kahjurputukate eest ja vähendada herbivooriat imetajate poolt (Flecher, 1986; Schardl, 2009).

Praeguseks on uurimustööde tulemusel patenteeritud mitmeid söödataimede sorte, mis sisaldavad endas taimedele kasulikke ja imetajatele mittetoksilisi endofüütidesid. Endofüütide poolt pakutavat kasu taimekaitstes uuritakse ka inimtoidus kasutatavatel taimedel, näiteks maisi, soja, viinamarjade jt. agrokultuuride kahjurite kontrollil (Varma et al, 1998)

Paratamatult jääb mingi osa pestitsiididest peale nendega taimede töötlemist taimedesse alles ning satub. On näidatud, et mitmed fungitsiidid on kahjulikud ka imetajatele, mõjutades laboriloomade reproduktiivsust, kahjustades hiirtel ja küülikutel loote arengut, kahjustades katseloomade verevalke, siseorganeid, kesknärvisüsteemi ning pestitsiididena keskkonda viidavad toksilised ühendid on ilmseks murekohaks. Mitmed fungitsiidid omavad ka fütotoksilisi efekte (Butt et al, 1973). Üheks ilmseks põhjuseks miks eelistada taimkaitse kemikaalide asemel endofüütseid mikroorganisme on viimaste abil saavutatud taimekaitse keskkonnasõbralikum ja puhtam meetod.

Kuna taimede pestitsiididega töötlemine mõjub valimatult nii kahjuritele kui ka taimedele kasulikele mikroorganismidele, võib agrokemikaalide, sh. fungitsiidide liigtarvitamine pika

perioodi vältel vähendada taimede üleüldist kohastumust ning viia tasakaalust välja taimedega seotud mikroorganismide koosluse. Seetõttu on vajalikud taimede ja nendega seotud mikroorganismide vaheliste ökoloogiliste suhete igakülgsed uuringuid.

Fungitsiidid on laiaulatuslikult kasutatavad taimekaitsevahendid, kuid nende toimet endofüütidele on vähe uuritud (Mohandoss 2009). Käesolevas töös uuritakse kui tundlikud on endofüütsed seened taimepatogeenidetõrjeks väljatöötatud fungitsiidide suhtes, kas fungitsiididega töötlemine mõjutab endofüütide rohkest ja liigilist koosseisu põldtimutis ja mis rolli mängivad sealjuures erinevad kasvutingimused. Selleks uuritakse fungitsiidide toimet nii monokultuuris ja avamaa tingimustes kasvanud taimedele, silopõllul kasvanud taimedele kui ka poollooduslikus, metsaga ümbritsetud tingimustes kasvavatele taimedele.

2. Materjal ja metoodika

2.1. Fungitsiidide valimine

Katse jaoks valiti Eesti Põllumajandusameti (<http://www.pma.agri.ee>) poolt koostatud Eestis turustatud taimekaitsevahendite nimestikest viis enimturustatud ja samas põldtimutile sobivat fungitsiidi (Amistar, Bumper 25 EC, Folicur 250 EW, Opus EC, Thiovit Jet). Taimi pritsiti lähtuvalt soovituslikest kulunormidest fungitsiidide etikettidel. Kuna spetsiifiliselt ainult põldtimutile mõeldud fungitsiide Eestis ei turustata ning üldiselt selliseid fungitsiide, mida oleks soovitatud kasutada ka põldtimutile on väga vähe, siis enamik katses kasutatud fungitsiididest on valitud teraviljadele kasutamiseks mõeldute hulgast. millest omakorda valiti need fungitsiidid, mille poolt tõrjutavate haigustekitajate nimestikus oli kõige rohkem selliseid, mida leidis ka timuti haigustekitajate hulgas. Näiteks kuna timutil esineb kahjuritena jahukastet, kroonroostet, lumiseent ja äärislaiksust siis valiti selline fungitsiid, mille toimespetsiifika hõlmas kõiki või mõnda neist timutil esinevatest kahjurseentest. Fungitsiidide valikul arvestati ka seda, kas fungitsiidi oli varem heintaimede katsetes kasutatud. Kuna fungitsiide jagatakse toime järgi üldjoontes kaheks: kontaktseteks ja süsteemseteks fungitsiidideks siis sai valitud fungitsiide nende mõlema rühma esindajate seast. kuid pannes rõhku rohkem süsteemsetele fungitsiididele, kuna nende mõjuala on kogu taimekoe ulatuses, seega ulatudes ka taime sees olevate endofüütideni.

Kontaktsete fungitsiidid on fungitsiidid, mis kaitsevad taimi muutes peale pritsimist nende pinnakihi patogeenidele vastuvõetamatuks. Süsteemsed fungitsiidid on fungitsiidid, mis peale pritsimist taime imendudes kaitsevad neid kogu taimekoe ulatuses, sarnanedes niimoodi antibiootikumidele.

Katses kasutatud süsteemsed fungitsiidid:

Tebukonasool ((*RS*)- 1-(4-klorofenüül)- 4,4-dimetüül- 3-(1,2,4-triasool-1-üülmetüül)pentaan-3-ool; 250g/l, 'Folicur 250 EW'), triasoolide grupp

Asoksüstrobiin (metüül (2*E*)-2-(2-([6-(2-tsüanofenüül)pürimidiin-4-üül]oksü) fenüül)-3-metoksüakralaat; 250g/l, 'Amistar'), strobiluriinide grupp

Epoksikonasool ((2*RS*,3*SR*)-1-[3-(2-klorofenüül)-2,3-epoksü-2-(4-fluorofenüül)propüül]-1*H*-1,2,4-triasool; 38g/l, 'Opus EC') triasoolide grupp

Propikonasool (1-[[2-(2,4-diklorofenüül)-4-propüül-1,3-dioksolaan-2-üül]metüül]-1,2,4-triasool; 250g/l, 'Bumper 25 EC'). triasoolide grupp

Kontaktseks fungitsiidiks sai valitud **väävlil** põhinev fungitsiid ('Thiovit Jet', väävel; 800g/kg).

2.2. Katse aeg ja koht

Katse viidi läbi 2012 aasta suvel (juuli keskpaik kuni augusti esimesed nädalad).

Et kindlaks teha, kas endofüütide liigirikkus põldtimutis sõltub kasvukohast, viidi katse läbi kolmes erinevas kasvukohas: 1) põldtimuti monokultuurpõllul Tartu lähistel, Kandikülas (58°22'57.56"N, 26°39'19.54"E), timuti-ristiku segapõllul Tartu maakonnas Uniküla lähedal (58°16'3.76"N, 26°53'45.70"E), 3) pool-looduslikul rohumaal Tartu Maakonnas Rõkal (58°14'41.42"N, 27°18' 3.88"E).

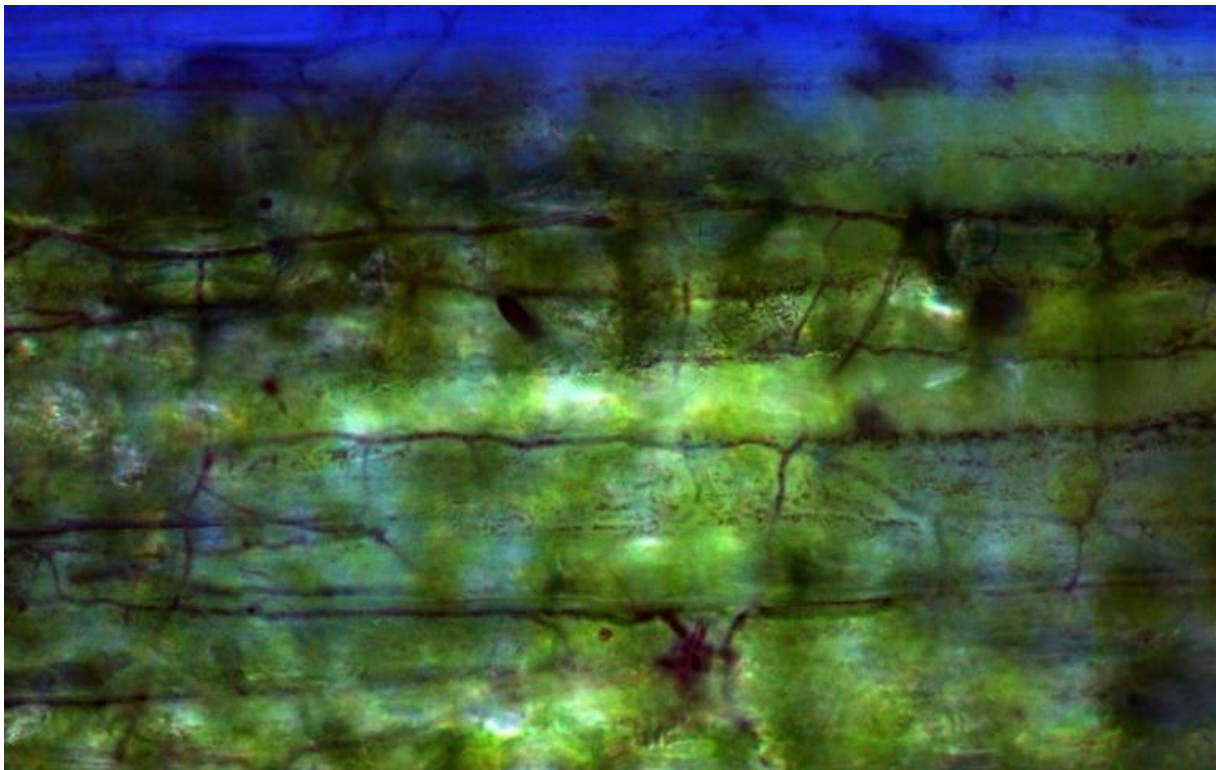


Joonis 2. Katse läbiviimiseks valitud kolm erinevat kasvukohta (märgituna punasega)

Igas kasvukohas valiti viis 1m² pindalaga katselappi, millest igähte pritsiti erineva fungitsiidiga. Katselappide keskmiseks kauguseks üksteisest oli 5m. Töötlemata kontrolltaimed koguti mitte lähemalt kui 5 m. katselappidest

2.3. Endofüütide olemasolu kindlakstegemine taimes mikroskopeerimise abil

Timuti lehtede tükke värviti toluidiin sinisega ja vaadeldi mikroskoobis Zeiss Axioskop 40 FL koos kaameraga AxioCam MRc ja sellega ühilduva tarkvaraga Axio Vison 1.6.. Taimekoos olevaid seenehüüfid värvusid siniseks (Joonis 3).



Joonis 3. Toluidiin sinisega värvitud seenehüüfid timuti lehes.

2.4. Timutitaimede töötlemine fungitsiididega

Pritsimiseks välja valitud 1m² pindalaga katselapid märgistati ja taimi pritsiti fungitsiidide vesilahustega, mille valmistamisel lähtuti fungitsiidide agronoomilisel otstarbel kasutamiseks soovitatud kontsentratsioonidest. (Thiovit Jet - 4kg/ha; ülejäänud neli- 1kg/ha). Pritsimiseks

kasutati 0,5 liitrise mahuga pihustipudeleid järgides pritsimisel ohutusnõudeid ja tuule suunda (Joonis 4). Timutitaimi töödeldi juuli keskpaigas ning proovid koguti taimedelt 7-10 päeva peale pritsimist. Kõikides kasvukohtadest võeti kontrolliks proove ka fungitsiididega töötlemata taimedelt.



Joonis 4. Pritsimiseks kasutati 0,5 liitrise mahuga pihustipudeleid.

2.5. Endofüütide isoleerimine puhaskultuuri

7-10 päeva pärast pritsimist koguti igalt katselapilt neli taime. Fungitsiididega töötlemata kontrolltaimed koguti katselappide lähedusest, mitte kaugemalt kui 6-7 meetrit. Igalt korjatud taimelt lõigati lehetupe osast 5x5mm tükid. Lehetükid pindsteriliseeriti leotades neid 1 min 96% etnoolis, seejärel 3 minutit 0,1% klooriühendite lahuses (ACE), teist korda 1 minut 96% etanoolis ning lõpuks loputati destilleeritud vees.

Peale pindsteriliseerimist asetati taimetükid laminaarkapi all 9 cm diameetriga Petri tassidele nii maltoosi ekstrakti agarile (MEA) kui ka kartuli dekstroos agarile (PDA). Igale Petri tassile asetati 4 taimetükki, mis kuulusid ainult ühe töötamise taimedele. (Lisa 1). Tassid inkubeeriti temperatuuril 20-22 °C.

Taimetükkidest välja kasvasid endofüüdid eraldati edaspidiseks uurimiseks puhaskultuuridesse. Identifitseeritud tüved anti Eesti Maaülikooli Seente eluskultuuride kollektsiooni [TFC] hoiustamisele.

2.6. Puhaskultuuride mikroskopeerimine ja morfoloogiline analüüs

Endofüütide puhaskultuuridest võetud tükke vaadeldi ja pildistati kasutades mikroskoopi Zeiss Axioskop 40 FL koos kaameraga AxioCam MRc ja sellega ühilduva tarkvaraga Axio Vison 1.6. (Lisa 1 ja 2) Endofüütide määramiseks mõõdeti koniide. Mikroskoopiliste tunnustena vaadeldid ja mõõdeti endofüütsete seente koniidide suurust ja kuju (enamuses olid koniidid olemas) ja nende ornamentatsiooni, hüüfide morfoloogiat ja koniidikandjate ning ühel juhul (*Chaetomium* sp.) ka viljakeha kuju.

Ka timutitaimedest lõigatud tükke vaadeldi mikroskoobi all, värvides selleks lehetükke toluidiin sinisega. Vaadeldavad taimetükid võeti nii samadest taimedest, mida kasutati fungitsiidide katses, kui ka timutitaimedelt üldiselt. Vaatluse eesmärgiks oli näha taimekoes endofüüte.

2.7. DNA eraldamine ja amplifitseerimine

Molekulaarseks identifitseerimiseks eraldati isoleeritud endofüütidest DNA kasutades kitti Phire[®] Direct Plant PCR Kit (Thermo Fisher Scientific).

rDNA ITS regioonid amplifitseeriti kasutades praimereid ITS1F (5'-3': CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A) ja ITS4 (5'-3': TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (Gardes & Bruns 1993).

Polümeraasi ahelreaktsioon viidi läbi masinaga Biometra Professional Basic Thermocycler järgnevalt:

1. Denaturatsiooni alustamine 98°C – 5 min
2. 40 tsüklit:
 - 2.1 Denaturatsioon 98°C – 5 sek;
 - 2.2 59°C – 1 min;
 - 2.3 71°C – 20 min;
 - 2.4 72°C – 1 min
3. säilitus 4°C

2.8. Geelelektroforees

PCR produkti olemasolu kontrolliti geelelektroforeesil (Consort EV243 Cleaver). Selleks valmistati geel, mille koostiseks oli 100ml TBE (tris-boraat etüleendiamiin-tetraatsetaat), 1g agarose (Invitrogen elektroforees grade agarose), 7 µl etiidiumbromiidi. Valmistatud geel valati foreesivanni, lisati kammid. Jahtunud ja tardunud geel asetati foreesivanni ning valati üle TBE puhvriga. Igast PCR produktist võeti 5 µl, millele lisati 2 µl laadimispuhvrit ja see segu pipeteeriti kammide eemaldamisel tardunud geeli jäänud kaevukestesse. Peale PCR produktide ja laadimispuhvri segud geelile kandmist suleti foreesivann kaanega ja ühendati vooluvõrku (1h 15 min) 100 V, 300 mA ja 50 W juures. Peale foreesi töö lõppemist pildistati geelil jooksutatud proove UV valguses kasutades Cleaver UV Transilluminatorit koos fotoaparaadiga Canon.

PCR saadused sekveneeriti praimeriga ITS5 firmas Macrogen (Seoul, Lõuna-Korea). Madala kvaliteediga sekventsid re-sekveneeriti *praimeriga ITS4*.

2.9. Sekventsidega töötamine

Sekventse redigeeriti programmidega Sequencher 5 (Gene Codes Corps., Ann Arbor, MI, USA), Chromas 2.4.1 ja Chromas Lite 2.1.1 ning võrreldi järjestustega GenBank'is kasutades BLASTn algoritmi või blastn otsingut NCBI nukleotiidide andmebaasi suhtes. Kasutati ka seente järjestuste andmebaasis UNITE, blastn järjestuse analüüsi meetodit. Sarnasuse läve <97% ITS rDNA järjestustes kasutati liikide identifitseerimiseks, üle 97% sarnasusel loeti uuritavad järjestused referentsjärjestustega samasse liiki kuuluvaks.

Bakterite määramiseks kasutati MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) mass spektromeetrit (BrukerDaltonik MALDI Biotyper) Helle Järve juhendamisel TÜ Biomeedikumis.

Andmete statistiliseks töötlemiseks, mis saadi viie fungitsiidi kasutamisel kolmets erinevas kasvukohast kasutati ANOVA ja Hii-ruut testi statistikaprogrammiga R.

3. Tulemused

3.1. Puhaskultuurist määratud endofüütid

3.1.1. Molekulaarsed meetoditega määratud liigid

Katsetaimedest saadi kokku ca 80 isolaati, mille hulgast 41 prooviti määrata DNA põhjal. Endofüütide identifitseerimisel arvestati, et kui endofüüdi ITS järjestuse protsentuaalne sarnasus geenipangas olevatega olid alla 97% siis ei loetud seda endofüüti samasse liiki kuuluvaks organismiga, kellele andmebaasis olev järjestus kuulus. Kõigist 41-st isolaadist saadud sekventsides oli 97-100% sarnasus geenipangas leiduvate referentsjärjestustega 26-el endofüüdil, kelle hulgast saadi kokku 14 erinevat kas liigini või perekonnani määratud endofüüti.

ITS rDNA järjestuste alusel ja MALDI-TOF analüüs abil määratud liigid on esitatud Tabelis 1. Tabelis ei ole toodud neid määranguid, mille ITS järjestuse protsentuaalne sarnasus geenipangas olevatega oli alla 97%.

Tabel 1. Põldtimuti lehtedest isoleeritud endofüütide arv sõltuvalt liigist.

Määrang	Timutitaimedest saadud isolaatide arv
<i>Acremonium sp.</i>	1
<i>Alternaria sp.</i>	4
<i>Cercospora sp.</i>	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3
<i>Eudarluca caricis</i>	1
<i>Filobasidium globisporum</i>	2
<i>Fusarium poae</i>	2
<i>Gloeotinia sp.</i>	4
<i>Lewia infectoria</i>	1
<i>Penicillium biourgeianum</i>	1
<i>Phaeosphaeria sp.</i>	2
<i>Ascomycete sp.</i>	1

Määrang	Timutitaimedest saadud isolaatide arv
<i>Rhizoctonia sp.</i>	2
<i>Pseudozyma graminicola</i>	2
<i>Verticillium leptobactrum</i>	1
<i>Chaetomium sp.</i>	1
<i>Sphingobacterium multivorum.</i>	1

Bakterid moodustasid isoleeritud materjalist ca 15%., MALDI-TOF analüüs bakteriliikide kohta andis piisava usaldusväärsuse lävega ainult ühe bakteriliigi üheksast uuritavast, mis määrati liigiks *Sphingobacterium multivorum.*

MALDI-TOF-iga saadud mitte nii hea tulemus bakteriliikide määramisel võis tuleneda sellest, et kasutatav referents andmebaas sisaldas kliiniliselt olulisi bakteriliike, ehk see polnud mõeldud endofüütide määramiseks.

Huvipakkuvaks oli ka erinevatest kasvukohtadest kogutud taimedetükkidest välja kasvanud kaks samasugust endofüüti, kellel olid ka omavahel identsed sekventsidsid ja sealjuures mõlemad hea kvaliteediga, kuid võrdlemisel GenBank'i andmebaasis olevate järjestustega oli kõige kattuvam (94%) *Kabatiella bupleuri.* Seda liiki on leitud ühest vahemere äärsetes riikides kasvavalt taimeliigilt (Bills et al, 2012). Kuna sekventsidsid neil kahel sarnasel endofüüdil olid hea kvaliteediga ja andmebaasist nende sekventsidsidega midagi sarnasemat ei leidunud kui *Kabatiella bupleuri* siis võiks arvata, et tegu on kas ühe uue endofüüdiliigiga või andmebaasis lihtsalt puudus vastav referentsjärjestus.

3.1.2. Puhaskultuuri morfoloogiliste tunnuste alusel määratud liigid

Enamusel puhaskultuuris kasvanud seentel olid koniidid olemas ning ühel juhul oli näha ka viljakeha (*Chaetomium sp.*). Selle teleomorfse liigi täpsem määramine seisab alles ees.

Puhaskultuuri tunnuste alusel määrati endofüüte veel järgmistest perekondadest *Acremonium sp.*, *Penicillium sp.*, *Verticillium sp.* Üks kultuur õnnestus määrata liigini *Fusarium poae.* Nendel liikidel oli kõigil näha ka koniide. Morfoloogia põhists määramist kinnitas ka rDNA ITS analüüs.

3.2. Fungitsiidide toime endofüütidele kolmes erinevas kasvukohas

Katse tööhüpotees oli, et fungitsiididega töödeldud taimed omavad võrreldes töötlemata taimedega vähem endofüüte. Katsete tulemused on esitatud Tabelis 2.

Tabel 2. Taimetükkidest välja kasvanud endofüütide arv vastavalt kasvukohale ja fungitsiiditöötlusele.

Fungitsiid/ Kasvukoht	0-katse	Amistar	Bumper 250 EC	Folicur	Opus	Thiovit Jet
Rõka	5	2	1	0	5	2
Uniküla	7	4	6	4	6	4
Kandiküla	5	3	4	5	3	5
Kokku	17	9	11	9	14	11

ANOVA tulemuste alusel on ainuke faktor, mis tabelis toodud arve mõjutab kasvukoht. Siin on oluline erinevus Uniküla ja Järvelja vahel, Unikülas esineb keskmiselt 2,7 rohkem ($p=0.021$) endofüüte.

Ükski antud katses kasutatud fungitsiid ei mõjuta taimedest leitud endofüütide arvu. Põhjus, miks me ei saa tõestada, et erinevus on oluline, on selles, et andmeid on vähe ja nad on üpris varieeruvad. Selleks, et testida, kas eri katsed annavad eri kohtades erinevaid tulemusi, oleks vaja rohkem andmeid.

Hii-ruut test ei tõesta, et sagedustabelis olevad arvud jaotuks kuidagi erinevalt katsemeetodite ja kohtade mõjul.

Arvult kõige vähem endofüüte kasvas välja taimetükkidest, mis olid võetud taimedelt, mida oli pritsitud fungitsiididega Amistar ja Folicur (mõlemal juhul kõigi katsevariantide peale kokku 9 tk., ehk 47,0% vähem kui 0-katses). Rohkem endofüüte kasvas välja taimetükkidest, mida oli pritsitud fungitsiididega Bumper ja väävlipõhine Thiovit Jet (mõlemal juhul kõigi katsevariantide peale kokku 11 tk., ehk 35,2% vähem kui 0-katses). Kõige rohkem kasvas endofüüte välja taimetükkidest, mida oli pritsitud fungitsiidiga Opus (kõigi katsevariantide peale kokku 14 tk., ehk 17,6%). Töötlemata kontrolltaimedelt võetud tükkidest kasvas kõigi

katsevariantide peale kokku 17 endofüüti. Ühe fungitsiiditöötlaste peale üle kõigi katsevariantide kasvas taimetükkidest keskmiselt välja 10,8 endofüüti, mis on 36,5% vähem kui 0-katses kõikide katsevariantide peale kokku taimetükkidest väljakasvanud 17 endofüüti, viidates kasutatud fungitsiidide endofüüte vähendavale toimele timutitaimedes.

3.3. Antagonismi ilmingud samas taimes/katseruudud kasvavate endofüütide vahel

Nii mõnelgi juhul ilmnes, et samast kasvukohast, samast katseruudust kogutud timuti endofüütide vahel esines antagonismi ilminguid (Joonis 5). See asjaolu võib pakkuda huvi edaspidistes uuringutes.



Joonis 5. Antagonistlikud suhted timutist eraldatud endofüütide vahel.

4. Arutelu

Käesolevas töös kasutatud fungitsiidide tebukonasool, asoksüstrobiin, epoksikonasool, propikonasool toimete kohta võib kirjandusest leida andmeid, et neil mõnel juhul on mõju endofüütidele ja mõnel juhul mitte. Näiteks tebukonasooli on edukalt kasutatud taimede endofüüdivabaks muutmisel.

Fungitsiidi folicur ja tebukonasool on kasutatud edualt seeneperekonna *Alternaria* sp.vastu

Propikonasool on avaldanud endofüütidele võrreldes mõnede teiste fungitsiididega tugevaimat toimet (Gamboa Gaitan et al, 2005; Harvey et al, 1982), kuid nendes töödes on võrdluseks teised fungitsiidid, mitte need, mida siinolevas katses kasutati. Samas on näidatud, et propikonasool ei omanud endofüütse seene *Puccinia graminis* suhtes vähendavat efekti omab aga märkimisväärset toimet liikidele *Didymella phleina*, *Alternaria* spp. ja *Cladosporium* spp. (Riesen & Close, 1987). On näidatud et propikonasool kontsentratsioonis 1-2 kg/ha vähendab endofüütide sisaldust taimedes ligikaudu 10% võrreldes kontrolltaimedega. Mõnel juhul on näidatud ka et kontsentratsioonis 2kg/ha võib propikonasool vähendada endofüütide sisaldust taimedes kuni ligikaudu 80%.

Propikonasool on ka fütotoksiline, mistõttu ei ole soovitatav seda taimekaitsel liiga suurtes kogustes kasutada.

Väävel on üks vanim kasutatud pestitsiid olles teadaolevalt kasutusel juba ligikaudu viimase 1000 aasta jooksul. Tema toimemehhanismiks seentele on raku hingamise ja elektrontransporti inhibeerimine. Ta on küll efektiivne kaitsevahend erinevate seenhaiguste vastu, kuid suuremates kogustes omab taimedele fütotoksilist efekti. Varasemalt pole vääveli toimet endofüütide suhtes proovitud, kuid ilmselt mingis koguses võib see ka taime pritsimisel imenduda taime ning omada niimoodi toimet endofüütsetele seentele.

Käesolev katse analüüs näitas, et ükski antud katses kasutatud fungitsiid ei mõjutanud taimedest leitud endofüütide arvu (Tabel 2). Kas endofüütsete seente liigirikkus ja arvukus sõltub

erinevate fungitsiidide toimest ja kasvukohtadest vajab veel täpsemat uurimist. Kuigi fungitsiididega töödeldud taimedes oli endofüütide arvukus võrreldes kontrolltaimedega väiksem ning erinevatel fungitsiididel erinev, on siiski katses olnud kordusi liialt vähe, et teha nende põhjal kindlaid järeldusi nii fungitsiidide üldiste toimete kui ka liigispetsiifiliste toimete kohta endofüütidele.

Samas ilmnes, et erinevates kasvukohtades esines olulisi erinevusi endofüütide arvukuse ja liigilises koossesu poolest. Unikülas esineb keskmiselt 2,7 rohkem ($p=0.021$) endofüüte kui Järvelas.

Kandikülast timuti monokultuurpõllult kogutud taimedes esines rohkem *Alternaria* perekonna liike, kui Rõkalt kogutud poollooduslikul metsaga ümbritsetud heinamaal kasvanud timutitaimedes. Kandikülast kogutud taimed olid vanema väljanägemisega kui Rõkalt ja Uniküla lähedalt kogutud taimed ning kuna kirjandusest võib leida, et mida vanemad on taimed siis seda rohkem leitakse neist endofüüte siis selles võis olla ka põhjus miks sellest katsekohast võtud proovidest kasvas üldiselt välja kõige rohkem endofüüte ja liigiline koosseis näis olevat ka homogeensem ja fungitsiidide mõju ei tulnud nii selgelt välja.

Timutitaimedest väljakasvanud endofüütidest olid 85% seeneliigid. Bakteriliike ilmnes vähem, umbes 15% kõigist isoleeritud endofüütide liikidest (Tabel 1). Bakteriliikide vähene esinemine timutitaimedest väljakasvatatud endofüütide seas võrreldes seeneliikidega ühtib ka kirjanduse põhiseaga, et taimedest isoleeritud endofüütide hulgas on bakteriliigid vähemuses. Selle põhjuseks võib olla bakteriliikide vähene kultiveeritavus.

S. multivorum on bakteriliik, millel on väga lai elupiirkond. Seda on leitud nii pinnasest, seentest, taimedest ja ka inimverest – viimane võiks ka selgitada miks see liik tuli välja kliiniliselt oluliste bakteriliikide andmebaasiga võrdlemisel.

Endofüüdikultuuride nii makroskoopiliste kui mikroskoopiliste morfoloogiliste tunnuste põhjal määrati perekonna tasemeni viis endofüüti ja liigi tasemeni üks endofüüt. Kultuuris viljakeha kasvatanud liik vajab veel täpsemat määramist.

Enamik timutitaimedest isoleeritud endofüütsetest seentest kuulusid kottseente (*Ascomycota*) hõimkonda. Üldiselt on mikroseente koloonia kuju ja värvus üsna muutlik sõltudes nii söötme koostisest, koloonia vanusest ja teistest teguritest, mistõttu ainult koloonia välimuse põhjal endofüütide määramine on paljudel, kui mitte enamikel juhtudel, praktiliselt võimatu. Seetõttu on oluline molekulaarete tunnuste kasutamine.

Kokkuvõte

Püstitatud hüpotees käesolevas töös ei tõestunud. Ei suudetud tuvastada, et ükski antud katses kasutatud fungitsiid oleks mõjutanud taimedest leitud endofüütide arvu, mis võib aga olla tingitud katseandmete vähesusest. Küll aga selgus, et erinevatel kasvukohtadel on mõju endofüütide arvukusele. Põldtimuti taimed, mis kasvasid avamaa tingimustes, omasid rohkem endofüüte kui taimed, mis kasvasid pooleldi suletud, metsaga ümbritsetud alal Rõkal. Selgus ka, et taimede kasvukoht mõjutab endofüütide liigilist struktuuri taimekoosluses. Tüüpilisemateks endofüütideks põldtimutis olid endofüüdid seeneperakondadest *Alternaria sp.* ja *Gleotinia sp.* Märgati ka, et vanematel taimedel oli rohkem endofüüte. Oleks vaja edasist uurimist selleks, et kindlaks teha, kas fungitsiidide toimed on endofüütidele liigispetsiifilised ning kuidas oleks kõige optimaalsem kasutada fungitsiide lähtudes endofüütide võimalikust kasust taimedele.

Esialgsete tulemustega esineti Saksamaal, Berliinis 27-29. 05. 13 toimunud konverentsil "Endophytes for plant protection: the state of the art" postriiga, mis avaldati ka konverentsi kogumikus (Sirkel ja Kullman, 2013).

Summary

Endophytes associated with timothi-grass (*Phleum pratense* L.) and the effects of fungicides on them

All plants in natural ecosystems appear to be in symbiotic relationships with endophytic fungi that live inside plant tissues without causing any apparent symptoms. Endophytes are seen as promising alternatives to agrochemicals increasing fitness of plants by conferring abiotic and biotic stress tolerance, increasing biomass, and decreasing water consumption. It may be possible that overuse of agrochemicals, e.g. fungicides, may decrease overall plant fitness in long-term usage by unbalancing the ecosystem of microorganisms associated to plants.

In this experiment the effects of five different fungicides on endophytes in timothi-grass (*Phleum pratense*) are studied. Fungicides were used to treat timothy-grass plants in open field environment. Four of them were systemic fungicides tebuconazole ('Folicur 250 EW'), azoxystrobin ('Amistar'), epoxiconazole ('Opus EC'), propiconazole ('Bumper 25 EC') and one was sulphur based contact fungicide ('Thiovit Jet'). Fungicides were selected based on Estonian Agricultural Board's reports on annual plant protection products sales in Estonia so that according to annual sales quantity the most commonly used fungicides suitable for timothi-grass were chosen. Experiment was carried out in three different locations in Estonia of which two locations were campestrial (timothi-grass monoculture field near Tartu and forage grass field near Uniküla) and one location was forest surrounded half-natural meadow patch near Järvselja.

1 m² grass patches were used for every fungicide treatment. Nontreated plants, used for a control, were collected near by these patches. Plants were sprayed with fungicides in agronomically recommendable concentrations in the middle of Estonian summer (mid July, first week of august)

After 1.5-2 weeks from spraying, from every treatment patch four plants were selected and collected. About 0,25 cm² peaces of leaf blade sheats from collected plants were used to culture on PDA after surface sterilizeing. Endophytic species that grew out from plant samples were determined by morphological, MALDI-TOF MS and ITS rDNA analysis.

Althou more experiments are needed the plants treated by fungicides had lesser endophytes compared to nontreated controlplants that suggests that fungicides have a decreasing effect to endohytic colonisation in plants.

From the endophytic species that grew out from plant samples of timothi-grass four were identified to species level, twelve to genus level so far and one possible new species discovered for timothi-grass.

We noticed also from our experiment that plant endophytic biodiversity is in open fields smaller than in the part of experiment where samples were collected from plants growing in forest surrounded meadow patch, suggesting plant growth environment influence on endophytic species distribution in plant communities. Noticeable was also that older plants tend to have more endophytes.

Tänuavaldused

Avaldan tänu oma juhendajatele Bellis Kullmanile Eesti Maaülikoolist ja Leho Tedersoole Tartu Ülikoolist ja kõigile neile, kes olid abiks selle töö läbiviimisel. Tänan eriti Bellis Kullmani, kui oma põhi juhendajat igakülgse abi ja nõu eest töö teostusel. Aitäh! Tänan Leho Tedersood sekveneerimisega seotud küsimuste lahendamisel ning doktorant Triin Varvast, kellest oli palju abi laboris ning katse läbi viimisel. Tänan laborispetsialisti Helle Järve Tartu Ülikooli Kliinikumist bakteriliikide määrata aitamisel MALDI-TOF mass-spektromeetriga ja Marina Haldnat statistikaga seonduva nõu eest ning kõiki neid, kes olid abiks, nõuks ja jõuks.

Kasutatud kirjandus

Arnold, A.E. and L.C. Lewis. (2005) Evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. *Ecological and Evolutionary Advances in Insect-Fungus Associations* (F. Vega and M. Blackwell, eds.). Oxford University Press, Oxford. 74-96.

Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E. A. (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 15649–15654.

Aschehoug, E. T.; Metlen, K. L.; Callaway, R. M.; Newcombe, G. (2012) Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Ecology*, 93 (1), 3-8.

Betina, V. (1984). Indole derived tremorgenic toxins. In: *Mycotoxins Production, Isolation, Separation and Purification* (Betina, V., ed.). *Developments in Food Science*, Vol. 8. New York: Elsevier.

Bidartondo, M. I., Read, D. J., Trappe, J. M., Merckx, V., Ligrone, R. and Duckett, J. G. (2011) The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biol. Lett.*

Butt, D. J., Kirby, A. H. M., Williamson, C. J. (1973) Fungitoxic and phytotoxic effects of fungicides controlling powdery mildew on apple. *Annals of Applied Biology*, 75 (2): 217–228

L. S. Bittleston, L. S., Brockmann, F., Wcislo, W., Bael, S. A. V. (2011) Endophytic fungi reduce leaf-cutting ant damage to seedlings. *Biol. Lett.* 7 (1): 30-32.

Correa, J. A. & McLachlan, J. L. (1994) Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). V. Fine structure of the infection by *Acrochaete operculata* (Chlorophyta) .

Dreyfuss, M. M. & Chapela, I. H. (1994) Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. /Raamatust: Gullo, V.P., *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*. Butterworth-Heinemann, Boston, 49–80.

Faeth, S.H., Sullivan, T.J. (2003) Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *Am Nat.* 161(2): 310-25.

Faville, M. J., Koulman, A., Briggs, L., Cao, M., Podmore, C., Abraham, D. (2007) Exploring endophyte compatibility in perennial ryegrass. *New Zealand Grassland Association: Endophyte Symposium*. 143-146.

- Flecher, L. R. (1986) *Lolium* endophyte and sheep performance on perennial ryegrass cultivars *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 47: 99-105
- Hyde, K. D., Soyong, K. (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, 163–173.
- Kogel, K., Franken, P., Hückelhoven, R. (2006) Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 358–363.
- Krings, M., Taylor, T. N., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N. & Hermsen, E. J. (2007) Fungal Endophytes in a 400-million-yr-old Land Plant: Infection Pathways, Spatial Distribution, and Host Responses. *New Phytologist*, 174, 648-657.
- Kumar, A., Mangla, C., Aggarwal, A. (2013) Biodiversity of Endophytic Mycorrhizal fungi associated with some medicinal plants of Himachal Pradesh. *Asian J. of Adv. Basic Sci.*: 1(1), 26-29.
- Krings, M., Taylor, T. N. & Dotzler, N. (2012) Fungal Endophytes as Driving Force in Land Plant Evolution: Evidence from the fossil Record. *Biocomplexity of Plant – Fungal Interactions*, First Edition. Wiley-Blackwell, 1k 5-28.
- Mano, H., Morisaki, H., (2008) Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environ.*, 23(2):109-117.
- Mohandoss, J.; Suryanarayanan, T. S. (2009) Effects of fungicide treatment on foliar fungal endophyte diversity in mango. *Sydowia*, 61 (1), 11-24.
- Mostert, L., Crous, P.W., Petrini, O. (2000) Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52 (1), 46-58.
- Partida-Martínez, L. P., Heil M., (2011) The microbe-free plant: fact or artifact? *Front. Plant Sci.*:100.
- Okamoto, N., Nagumo, T., Tantaka, J., Inouye, I., (2003) An endophytic diatom *Gyrosigma coelophilum* sp nov lives inside the red alga *Coelarthrum opuntia*. *Phycologia*. 42(5): 498-505.
- Popay, A.J., Hume, D.E. (2011) Endophytes improve ryegrass persistence by controlling insects. *Pasture Persistence – Grassland Research and Practice Series* 15: 149-156.
- Schardl, C. L. (2009) Fungal Endophytes in *Lolium* and *Festuca* Species Molecular Breeding of Forage and Turf 285-298.
- Singh, L. P., Gill, S. S., and Tuteja, N., (2011) Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signal Behav.* 6(2): 175–191.

- Rodriguez, R. J., Henson, J., Volkenburgh, E. Van, Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Yong-Ok & Redman, R. S. (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal* 2, 404–416.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., Redman, R. S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 314–330.
- Rommert, A. K., Dammann, U., Aust, H. J., Strack, D. (1999) The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological research*. 103 (10): 1275-1283.
- Rowan, D.D.; Hunt, M.B.; Gaynor, D.L. (1986). "Peramine, a novel insect feeding deterrent from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium loliae*". *J. Chem. Soc. Chem. Commun* 1986: 935–936.
- Russell J. R., Regina S., R., and Henson, J. M., (2004) Symbiotic Lifestyle Expression by Fungal Endophytes and the Adaptation of Plants to Stress: Unraveling the Complexities of Intimacy. *The Fungal Community*, 683-695.
- Rutschmann, J. & Stadler, P.A. (1978). Chemical background. In: *Ergot Alkaloids and Related Compounds* (Berde, B. & Schild, H.O., eds.) Berlin: Springer-Verlag.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., Sullivan, T. J. (1998) Fungal endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 29: 319-34.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H. (2004) Evolution of endophyte–plant symbioses.
- Schulz, B. & Boyle, C. (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109, 661–686.
- Selvanathan, S., Indrakumar, I. & Johnpaul, M. (2011) Biodiversity of the Endophytic Fungi Isolated from *Calotropis gigantea* (L.) R.Br. *Recent Research in Science and Technology*, 3, 94-100.
- Shimanuki, T. (1987) Studies on the mechanisms of the infection of timothy with purple spot disease caused by *Cladosporium phlei* (Gregory) de Vries. *Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 148.
- Singh, L. P.; Gill, S.; Tuteja, N. (2011) Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signal Behav.* 6(2): 175–191.
- Sirkel, H.; Kullman, B. (2013) Effects of Fungicides on Endophytic Fungi in Timothy-Grass (*Phleum pratense*). In: Schneider, C.; Leifert, C.; Feldmann, F. (Toim.). *Endophytes for plant protection: the state of the art.* (189). Braunschweig: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft.

Stone, J.K., Polishook, J.D., White, J.F., (2004) Endophytic fungi. In: Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods (Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S., eds). Elsevier Academic Press, San Diego, USA. 241–270.

Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., Barac, T., Vangronsveld, J., Lelie, van der D., (2009) Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol 75, no 3, 748-757.

Trémouillaux-Guillermo, J., Rohr, T., Rohr, R., Huss, VAR (2002) Discovery of an endophytic alga in Ginkgo biloba. *American Journal of Botany*, 89, (5), 727-733.

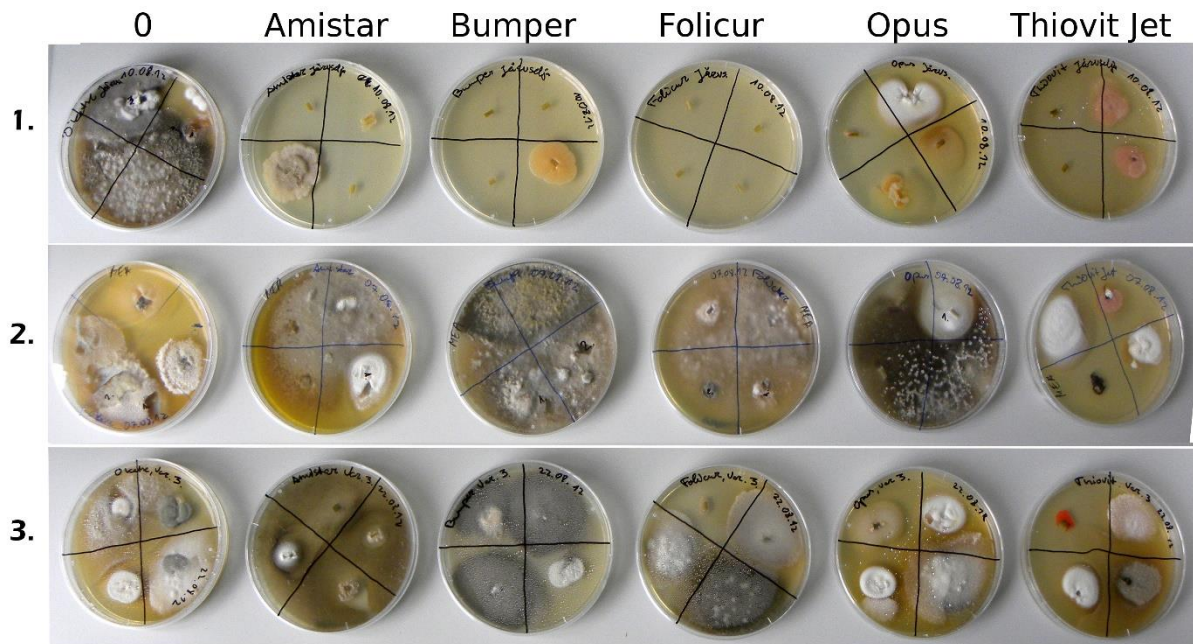
Varma, Ajit; Verma S., Sudha, Nirmal S., Bütchorn B., Franken P. (1998) Piriformospora indica, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (6): 2741–2744.

Varvas, T., Kasekamp, K., Kullman, B. (2013) Preliminary study of endophytic fungi in timothy (*Phleum pratense*) in Estonia. *Acta Mycologica*, 48(1), 41 – 49.

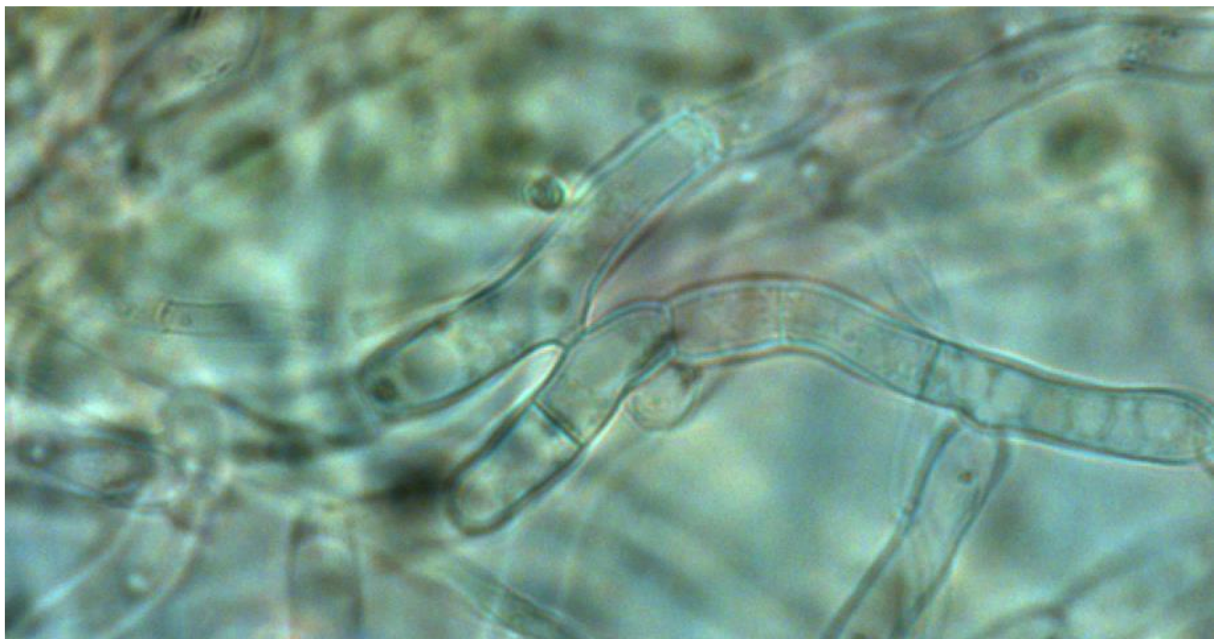
Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S. H. (2004) Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9(6): 1360-1385

Bills, G. F., Menéndez, V. G., Platas, G. (2012) *Kabatiella bupleuri* sp. nov. (Dothideales), a pleomorphic epiphyte and endophyte of the Mediterranean plant *Bupleurum gibraltarium* (Apiaceae). *Mycologia*, 104(4): 962-73

Lisad



Lisa 1. Endofüütide väljaksvatamine fungitsiididega töödeldud timutitaimedest. 1- proovid Rõkalt 2- 3-



Lisa 2. Anastomoos endofüüdi puhaskultuuri hüüfide vahel.

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele
kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, **Hannes Sirkel**,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Põldtimuti (*Phleum pratense* L.) endofüüdid ja fungitsiidide toime neile,

mille juhendajad on **Bellis Kullman ja Leho Tedersoo**,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus/Tallinnas/Narvas/Pärnus/Viljandis, **26.05.2014**