

TARTU ÜLIKOOL

Loodus-ja täppisteaduskond

Ökoloogia ja Maateaduste Instituut

Kai Ilves

Tartu Ülikooli Botaanikaia puittaimede endofüütsed seened

Magistritöö

Bioloogia

30 EAP

Juhendaja: Leho Tedersoo, PhD

Tartu 2019

Tartu Ülikooli Botaanikaaias puittaimede endofüütsed seened

Taimekudedes elavaid mikroorganisme nimetatakse endofüütideks selle mõiste laiemas tähenduses, mis hõlmab patogeene, mükoriisa ja juurenoodulite moodustajaid, saprotroofe ning endofüüte kitsas mõttes. Viimased on taimekudedes vähemalt osa oma elutsüklilist asümptomaatilisel elavad mikroorganismid. Endofüütsete seente ja nende peremeestaimede kommensalistlik suhe, mis lubab mõlemal osapoolel varieeruvate keskkonnatingimustega koos toime tulla, teeb võimalikuks nende leviku väljaspoole oma looduslikku levilat.

Käesoleva töö eesmärk oli kirjeldada Tartu Ülikooli Botaanikaaias puittaimede lehtedes ja juurtes leiduvat seenekooslust, et hinnata botaanikaaedade taimekollektsoonides esinevate seente ja nende peremeestaimede invasiivseks muutumise ohtu ning toimetulekut ja üldist kompositsiooni võõras elukeskkonnas. Püstitasin hüpoteesi, et Eesti päritolu puittaimed on oma seenekoosluselt mitmekesisemad ning botaanikaaias kasvavatel taimedel domineerivad kohalikud seeneliigid. Teadustöö tulemused näitasid, et endofüütide mitmekesisus ei sõltunud peremeestaimede päritolust ning osadel peremeestaimedel iseloomustas seenekooslusi pigem fülogeneetiline taust. Lehtedest ja juurtest isoleeritud seeneliigid olid erinevad nii oma liigiliselt koosseisult kui arvukuselt. Lehe-endofüütide mitmekesisus oli kõrgem kui juurtest määratud seentel ning mõlemad esines avamaa kollektsoonis kasvavatel taimedel rohkem kui kasvuhoones. Kohalike seente liigirikkus botaanikaaias oli madalam kui eksootiliste ja senitundmatute liikide oma kokku, kuid kodumaiste osakaal kogutud proovides oli viimastest kõrgem. Kasvuhoonet ei eelistanud oma kasvukohana mitte ükski sinne juure-endofüüt ning troopilist kasvukohta eelistavaid kohalikke lehe-endofüüte oli samuti võõrastest või senitundmatutest liikidest vähem.

Märksõnad: botaanikaaed, endofüüdid, seened, elurikkus, võõrliigid

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Tartu University Botanical Garden woody plant fungal endophytes

Microorganisms that inhabit plant tissues are called endophytes. In a broad sense, endophytes include pathogens, mycorrhizal and nodule-forming organisms, saprotrophs and endophytes sensu stricto. The latter are microorganisms that inhabit plant tissues asymptotically for at least as a part of their lifecycle. The commensalistic relationship between a host and an endophyte, which enables both of them to cope with changing environments, makes it possible for these organisms to spread to novel habitats outside their native range. The aim of this research was to describe the fungal community in leaves and roots of woody plants growing in Tartu University Botanical Garden to assess the threat of invasive species and the way these organisms are structured and coping within a habitat different from their own. The results showed that fungal richness was not related to host plant origin, but rather for some plant groups the differences in community structure were explained by phylogenetic relatedness. Fungi isolated from leaves and roots differed in species abundance as well as their overall richness. Leaf endophytes had higher species diversity than fungi determined from roots, but both of them occurred more frequently in outdoor plant collections. Exotic and unknown species were more diverse compared to the local fungi, although, the native fungal occurrence in both sample types was higher. No root-inhabiting endophytic fungi preferred the greenhouse environment as their growth habitat, while there were also less native leaf endophytes than unknown and alien species preferring the tropical environment.

Key words: botanical garden, endophytes, fungi, diversity, alien species

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Lühendid ja nende seletused	6
Sissejuhatus	7
1. Botaanikaaiad	8
1.1 Botaanikaaedade taimekollektsioonide mitmekesisus.....	8
1.2 Võõrliigid botaanikaaedades.....	9
2. Endofüüdid	11
2.1 Morfoloogilised ja biokeemilised tunnused	11
2.2 Keskkonnatingimuste mõju.....	13
2.3 Endofüütide paljunemine	15
2.4 Endofüütide levik	16
2.4.1 Juure-endofüüdid.....	16
2.4.2 Fülloosfääri endofüüdid.....	17
2.5 Endofüütide suhe peremeestaimega	19
2.5.1 Mutualism	20
2.5.1.1 Herbivooride vastane kaitse	20
2.5.1.2 Raskemetallide taluvus	21
2.5.1.3 Kuuma-ja põuastressi taluvus	22
Kasutatud metoodika.....	23
3. Uuringuala.....	23
4. Proovide kogumine.....	23
5. Molekulaarsed analüüsid.....	24
6. Järjestuste töötlemine	25
7. Statistilised analüüsid	26
8. Proovide andmebaasistamine ja andmestiku publitseerimine.....	28
Tulemused	30

Arutelu.....	37
Kokkuvõte	42
Summary.....	44
Tänuavaldused	46
Kasutatud materjalid	47
Lisad.....	65
Lisa 1. Fisheri testi tulemused lehe- ja juureproovidest.....	65
Lisa 2. Peremeestaimede fülogeneesipuu topoloogia.....	68
Lisa 3. Üldise lineaarse analüüsi tulemused.	69

Lühendid ja nende seletused

- BLAST** *Basic Local Alignment Search Tool*, andmebaasidest uuritavate sekventsidega sarnaste järjestuste leidmiseks kasutatav algoritm
- CD-HIT** *Cluster Database with High Tolerance*, nukleotiidsete või valguliste järjestuse võrdlemiseks ning klasterdamiseks mõeldud programm
- GBIF** *Global Biodiversity Information Facility*, kõigist maailma elusorganismidest avalikke andmeid koondav rahvusvaheline andmeportaal
- INSDC** *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, erinevatest digitaliseeritud andmekogudest DNA ja RNA andmejärjestusi koondav ning korrastav koondandmebaas
- ITS** *Internal Transcribed Spacer*, seente universaalse triipkoodina kasutatav ribosomaalse RNA väikese ja suure subühiku geenide vaheline lõik
- OTU** *Operational Taxonomic Unit*, omavahel lähedalt seotud indiviidide iseloomustamiseks kasutatav liigi tasemele vastav klassifikatsiooniühik
- PCNM** *Principal Coordinates of Neighbour Matrices*, objektidevahelise kaugusena välja arvutatud ajalisi või ruumilisi muutujaid iseloomustavad vektorid
- PCR** *Polymerase Chain Reaction*, DNA või RNA lõikude amplifitseerimise meetod
- PERMANOVA** *Permutational Analysis of Variance*, mitteparameetriline mitmemuutujaline statistilise analüüsi meetod
- RDA** *Redundancy Analysis*, põhjuslike ja neist sõltuvate muutujate lineaarse suhte iseloomustamiseks kasutatav analüüsimeetod
- SMRT** *Single Molecule Real-Time*, kõrge läbilaskevõimega DNA sekveneerimise meetod, mis kasutab fosfaatrühmaga seotud fluorestseeruvaid märgiseid ning reaktsioonianumate põhja valgustavat juhtsüsteemi

Sissejuhatus

Tänapäevase mükoloogia rajaja saksa botaanik, mükoloog ja mikrobioloog Heinrich Anton de Bary mainis esimest korda terminit endofüüt oma 1886. aastal avaldatud teoses „Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten“ (De Bary 1886). Ta kirjeldas nii seeni ja baktereid, kes elasid taimekudedes sees. Laias mõistes on seda terminit kasutatud kõikide taimekudedes elavate mikroorganismide määramiseks. Ligikaudu sada aastat hiljem on antud mõiste saanud juurde paar täpsustust. Endofüüdid ei põhjusta peremeestaimetele nähtavaid kahjustusi ning nad veedavad taimekudedes asümptomaatiliselt vähemalt ühe osa oma elutsüklist (Wilson 1995a). Selline piiritlus võimaldab endofüütidena (termini kitsas mõistes) käsitleda ka latentseid patogeene ja saprotroofe, ent jätab välja mükoriisat moodustavad seened ja ilma latentse staadiumita patogeene (Carroll 1988).

Endofüüte leidub peaaegu kõigis soontaimede liikides ning paljudes sammal- ning lehtsooneostaimedes (*Monilophyta*) (Arnold 2007). Sealjuures iga taimeliigi kohta arvatakse esinevat ligikaudu neli erinevat liiki endofüüte (Wilson *et al.* 1997). Arvutuste kohaselt võiks niisiis erinevaid endofüütseid seeneliike kokku olla ligikaudu miljon, seda arvestamata eluvormi vahetavaid seeni (Ganley *et al.*, 2004). Sellele suurele polüfüleetilisele seenerühmale hakati rohkem tähelepanu pöörama pärast seda, kui avastati, et endofüüdid toodavad palju erinevaid antibiootiliste või taimekahjureid tõrjuvate omadustega ainevahetusprodukte (Carroll 1988, Luo *et al.* 2015, Stierle ja Stierle 2015). Antud biokeemiline võimekus aitab muutlikus keskkonnas toime tulla, kuid võib anda ka väljastpoolt sissetoodud seeneliigile eelise uue keskkonna asustamisel. Sellman ja Bogner (2013) peavad oluliseks botaanikaaedade rolli kliimamuutuste ja sellega liikidele kaasnevate tagajärgede tuvastamisel. Kuna kliimamuutused koos elupaikade hävimise ning fragmenteerumisega loovad invasiivsete liikide leviku laienemisele soodsaid häiringuid (Chornesky ja Randall, 2003), saab botaanikaaeda kui võõrliikide hoidlat vaadelda väikeseskaalalise ökosüsteemi mudelina. Paljud invasiivseks muutunud taimed on esmalt sisse toodud just botaanikaaedadesse (Dawson *et al.* 2008, Galera ja Sudnik-Wójcikowska 2010), kus kasvatatakse lisaks majanduslikult olulistele taimedele ka haruldusi ning umbrohuliike. Vaatamata hästi dokumenteeritud taimedele pole botaanikaaedade seenekooslusi palju uuritud. Mõned botaanikaaiad dokumenteerivad küll leitud viljakehi (Krivtsov *et al.* 2003), kuid senini puudub põhjalik seenestikku ja selle mitmekesisust ühe või mitme botaanikaia piires käsitlev ülevaade.

Käesoleva uurimistöö eesmärk on hinnata Tartu Ülikooli Botaanikaaias puittaimede lehtedes ja juurtes elavate kohalike ning eksootiliste seente esinemissagedust ja peremeestaimede päritolu mõju endofüüdikoosluse mitmekesisusele. Antud uurimuses käsitlesin endofüütidena kõiki taimekudedes leidunud haigussümptomeid mittepõhjustanud seeni, sealjuures ka mükoriisa moodustajaid, saprotroofe ja muude taimede patogeene. Püstitan hüpoteesi, et kohalike puittaimede seenestik on liigirikkam ning neid taimi koloniseerivad pigem kohalikud seeneliigid. Kuna kinnistes tingimustes on seeneeoste levimine pikemate vahemaade taha raskendatud, eeldan, et kasvuhoones on endofüütide elurikkus madalam. Testin ka hüpoteesi, et kohalikke seeni on avamaa kooslustes rohkem kui kasvuhoones, sest kohalikud seeneliigid on siinsete oludega paremini kohastunud ning nende suurem arvukus jätab võõrastele seentele taimekudedes vähem nakatamiseks sobivaid kohti.

1. Botaanikaaiad

Botaanikaaiaks nimetatakse asutust, milles hoitakse liikide säilitamise ning eksponeerimise, haridusliku ja teadustööde tegemise eesmärgiga elustaimede dokumenteeritud kollektsioone (Wyse 1999). Maailmas on 148 erinevas riigis kokku üle 3000 botaanikaaias ning arboretumi, mille kollektsioonid katavad ligikaudu kolmandikku kõigist maailma soontaimeliikidest.¹

Esimeseks botaanikaaiaks loetakse Cosimo I de Medici 1544. aastal rajatud Pisa botaanikaaias Itaalias (Hill 1915). Järgneva 35-100 aasta jooksul ehitati neid rajatisi veel mitmetesse Põhja- ja Lääne-Euroopa riikide suurlinnadesse (Stearn 1971). Varajased botaanikaaiad erinesid tunduvalt sellest, mida me tänapäeval botaanikaaias käsitleme, sest nende ülikooli meditsiinosakonna teaduslinnakusse kuuluvate rajatiste eesmärk piirdus esialgu vaid ravimtaimede kasvatamise ja tundmaõppimisega (Hyams ja MacQuitty 1969, Spencer ja Cross 2017). Teised kultiveeritavad ja iluliigid jõudsid sinna hoopis hiljem. Üks vanim suur troopiliste taimede kollektsioon asus Hollandis Leideni botaanikaaias.² Selle asutajaks oli Hermann Boerhaave (1668-1738).

1.1 Botaanikaaedade taimekollektsioonide mitmekesisus

Vanimate botaanikaaedade taimekollektsioonid sisaldasid kohaliku päritolu taimi (Hyams ja MacQuitty 1969). Kui Osmanid vallutasid 1543. aastal Konstantinoopoli ja katkestasid Euroopa ühenduse nende peamise vürtsidega varustaja Aasiaga, hoogustus uute kaubateede otsimine (Spencer ja Cross 2017). Maadeavastuste käigus leiti ning kirjeldati uusi liike, mis

äratasid suurt huvi nende kultiveerimise vastu. Eksootiliste taimeliikide introductseerimine botaanikaaedadesse kasvas ning taimekolleksioonide täienemist erinevat päritolu taimede kaupa saab iseloomustada periooditi. Kraus (1894) on jaganud Euroopa botaanikaaedade kolleksioonide täienemise järgnevateks peatükkideks: kuni 1560. aastani introductseeriti taimi Euroopast ja Vahemeremaadest, 1560.-1620. aastani sibultaimi Lähis-Idast, 1620-1686. aastani rohttaimi Kanadast ja Virginiast, 1687.-1772. aastani taimi Lõuna-Aafrikast ning puid ja põõsaid Põhja-Ameerikast ja 1772.-1820. aastani taimi Austraaliast. Aastatel 1820-1900 lisati kolleksioonidesse troopilisi kasvuhoonetaimi ning vastupidavaid Jaapani ja Põhja-Ameerika liike (Stearn 1965). Lääne-Hiinast toodi taimi 1900.-1930.aastatel (Stearn 1971). Kolmekümnendatest aastatest alates on keskendutud sordiaretusele ning alates kaheksakümnendatest leidub botaanikaaedade kolleksioonides juba ka geneetiliselt modifitseeritud taimi (Spencer ja Cross 2017).

1.2 Võõrliigid botaanikaaedades

Botaanikaaedadel on ajalooliselt suur tähtsus liikide uude elupaika sattumisel (Dawson *et al.* 2008, Galera ja Sudnik-Wójcikowska 2010, Spencer ja Cross 2017). Williamsoni (1996) kolme kümne reegli järgi hakkab kümme protsenti kõigist uute elupaika sisse toodud liikidest seal kasvama, kümme protsenti naturaliseerub ning neist kümme protsenti muutub invasiivseks. See tähendab, et väga liigirikastes botaanikaaedades võib esineda mitmeid potentsiaalselt invasiivseid taimi või — nagu on käesoleva uurimistöo fookus — seeni. Lõunapoolsematelt aladelt pärit taimed on ohtlikud, sest nad on kohaliku kliima soojenemisel või niiskustingimuste muutumisel juba uute oludega kohastunud ning saavad kiiresti edasi levida (Hulme 2011). Kesk-Aasia päritolu väikeseõiene lemmalts *Impatiens parviflora*, mille varaseimad ülestäheldused pärinevad 1852. aastast (Kull *et al.* 2005), on Tartu Ülikooli Botaanikaia kolleksioonist Eestisse introductseeritud ja hiljem invasiivseks muutunud taimeliigi ilmekaimaks näiteks. Samast kohast on looduslikesse kooslustesse levinud ka Põhja-Ameerikast pärinev kanada kuldvits *Solidago canadensis* ning Lõuna- ja Kesk-Ameerikas kasvav karvane võõrkakar *Galinsoga ciliata* (Eek ja Kukk 2013). Dawson *et al.* (2008) ning Galera ja Sudnik-Wójcikowska (2010) leidsid, et erinevalt Williamsoni kolme kümne reeglist satuvad vaid umbes 3% taimedest kasvama botaanikaaedadest väljapoole ning seda nii troopilises kui ka parasvöötmelises kliimas asuvate botaanikaaedade puhul. Nad põhjendasid vähendatud hinnangut asjaoluga, et botaanikaaedades kultiveeritakse palju taimesorte, millel

on piiratud levimisvõime. Galera ja Sudnik-Wójcikowska (2010) näitasid, et sorditaimedest jääb uude kasvukohta püsima ligikaudu üks protsent.

Eksootilised taimed võivad levima hakata koos oma looduslikust elupaigast kaasa tulnud või uues elupaigas interakteeruvate seentega (Shipunov *et al.* 2008). Shipunov *et al.* (2008) kointroduktiooni hüpoteesi kohaselt võivad eksootilise taimega kaasa tulnud sümbiondid toimida keemilise relvana, millega uued naabrid veel kohastunud ei ole. Üks selline liik on näiteks Põhja-Ameerikasse sattunud *Centaurea maculosa*, mille nakatamiskatsel arbuskulaarset mükoriisat moodustavate seentega tuvastati tema negatiivne mõju teiste taimede kasvule (Marler *et al.* 1999). Võõrliikide sissetungi toetab ka nende looduslike vaenlaste puudumine uues keskkonnas. Mitchell ja Power (2003) leidsid naturaliseerunud taimeliikidelt looduslikus elupaigas kasvavate populatsioonidega võrreldes 84% võrra vähem seente ja 24% võrra vähem viiruste liike. Sarnast tulemust võiks eeldada ka seente ja nende looduslike vaenlaste puhul.

Botaanikaaedade seenekollektsioonide ja võimalike invasiivsete liikide kohta ei leidu vaatamata võõrkaaslejate ohule palju informatsiooni. Nii Euroopa komisjoni³ kui ka Eesti Keskkonnaministeeriumi⁴ ametlikes määrustes esinevad konkreetset taimede ja loomade võõrliikide definitsioonid, kuid seente puhul tuuakse parimal juhul välja vaid ohtlikud patogeendid. Kui makroskoopiliste organismide teise riiki sisse toomist ja tulemist on võimalik jälgida, siis mikroskoopiliste seente korral on olukord keeruline. Nii toodi näiteks Aasiast Põhja-Ameerikasse taimedega kogemata kaasa *Cryptonectria parasitica*, mis põhjustas kastanipuude (*Castanea dentata*) massilise hävingu ning millest tänaseni pole toibutud (Anagnostakis, 1987). Makroskoopiliste seente puhul valmistab probleemi nende viljakehade harv moodustamine. Näiteks Dawycki botaanikaaias seente viljakehade uurimisel märgati paljusid erinevaid liike viie aasta jooksul vaid korra (Krivtsov *et al.* 2003). Viljakehade moodustumist on lisaks harvale esinemisele ka keeruline ette ennustada. Bérubé ja Nicolas (2014) on Kanada näitel riiki imporditavast haigustunnusteta eluspuidust eksootiliste seeneliikide avastamiseks välja pakkunud järgneva meetodika: puidust võetud DNA proovide põhjal koostatakse fülogeneesipuu ning hinnatakse, kas seened kuuluvad patogeene sisaldavatesse taksonoomilistesse üksustesse. Patogeenidega võrreldes tundmatute endofüütsete invasiivide avastamiseks oleks sama meetodika kasutamiseks vaja korralikku ülevaadet ka selle eluvormiga seente mitmekesisusest ja fülogeneesist.

2. Endofüüdid

Laias mõistes on terminit endofüüt kasutatud kõikide taimekudedes elavate mikroorganismide määramiseks (Carroll 1988). Kitsas tähenduses on endofüüdid taimes selle kudesid kahjustamata kasvavad seened (Wilson 1995a). Multifunktsionaalsete seeneliikide puhul, kes talitlevad teatud eluetapis endofüüdi ning hiljem lagundaja või patogeenina, peetakse parimaks lahenduseks termini kasutamist vastavalt kontekstile. Tuleks täpsustada, kas endofüütsus iseloomustab organismi üldist eluvormi või valdavalt teistsuguse eluviisiga seeneliigi ühte eluetappi. Järgnevalt käsitlen endofüüte nende kitsamas mõistes, kui ei viita teisiti.

Endofüütsed seened (*sensu stricto*) on fülogeneetiliselt päritolult valdavalt patogeenid (Carroll 1988, Selosse *et al.* 2018) või saprotroofid (Promputtha *et al.* 2007). Tasakaalulise antagonismi hüpotees väidab, et nii kaua kuni taime kaitsemehhanismid vastavad seente virulentsusfaktorite tugevusele, suudavad peremees ja endofüüt üksteisele negatiivset mõju avaldamata koos eksisteerida (Kusari *et al.* 2012). Sagedased endofüütide liigid perekondadest *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Guignardia* ja *Phomopsis* on teiste oma perekonna saprotroofsete liikidega fülogeneetiliselt lähedalt seotud (Promputtha *et al.* 2007). Promputtha *et al.* (2007) leidsid, et eluvormi muutuse tingis ka neil endofüütidel peremeestaime füsioloogilise seisundi muutus. Nimelt väheneb taimekudede vananemisel nende füüsiline kaitsevõime, mis teeb lehte tungimise ja seal hüüfide kasvatamise seentele lihtsamaks. Lisaks muutub koos rakkude vanusega nende keemiline koostis ja toitainesisaldus (Brunt *et al.* 2006).

2.1 Morfoloogilised ja biokeemilised tunnused

Endofüütide (kitsas mõistes) mikroskoopiliste mõõtmete ja elupaiga mõju kajastub nende välistes tunnustes, millest antud eluvormi liigi tasemel määramiseks üldjuhul ei piisa. Taimekudedes hüüfidena paiknevate endofüütide vahel esinevad siiski mõned morfoloogilised erinevused. Näiteks rakukesta pigmenteerituse alusel saab endofüüdid jagada melaniseerunud ja hüaliinse rakukestaga seenteks (Peterson *et al.* 2008), kusjuures neist esimesed on boreaalsetes metsades väga sagedased (Kernaghan ja Patriquin 2011). Samuti on endofüütidel võimalik eristada vaheseintega ja vaheseinteta vorme (Peterson *et al.* 2008). Traditsiooniliselt eristatakse neid lisaks hüüfide pigmenteeritusele ja segmenteeritusele moodustatavate kolooniate ning eoste kuju, värvuse ja suuruse alusel. Gamboa *et al.* (2002) näitasid, et söötmele külvatud kolooniate morfotüüpide arvu põhjal saab hinnata tegelikku seeneliikide arvu, kusjuures morfoloogiliselt ning molekulaarselt määratud rühmade suhe on 1:2 (Stefani ja

Bérubé 2006). Endofüütide puhul nimetatakse morfotüübiks taksonoomiliselt tundmatuid sarnaste morfoloogiliste omadustega steriilseid mütseelikogumikke (Lacap *et al.* 2003). Seenekolooniate morfoloogia põhjal ei saa teha järeldusi endofüütsete seente fülogeneetiliste suhete kohta (Guo *et al.* 2000). Lisaks tuleb kolooniatepõhisel määramisel arvestada, et paljud mikroorganismid ei ole söötmel kasvatatavad (Ko Ko *et al.* 2011). Magnuson ja Lasure (2002) leidsid, et mullas elavatest seentest õnnestus kultuuris kasvatada kõigest väikest osa ning 80-90% kõigist seeneliikidest võivad tegelikult olla vähemalt sagedamini kasutatavatel söötmel mittekultiveeritavad.

Paljud endofüütsed seeneliigid toodavad erinevaid sekundaarseid metaboliite. Nende biokeemiat hakati põhjalikumalt uurima alles suhteliselt hiljuti (Carroll 1988, Clay ja Cheplick 1989, Miller 1986). Huvi seenendofüütide ainevahetusproduktide vastu tõusis järsult pärast vähivastase toimega taksooli avastamist lühiokkalise jugapuu *Taxus brevifolia* kooses ja okastes, mida koloniseerisid endofüütsed seened (Stierle ja Stierle, 2015). Avastuse juures oli veelgi erakordsem, et seen sünteesis täpselt sama keemilist ühendit, mida tema peremeestaim. Stierle ja Stierle (2015) kirjeldasid ajavahemikus 1991- 2014 koostatud ülevaates okaspuudelt isoleeritud mutualistlikel seentel teiste hulgas antimikroobseid, põletikuvastaseid, vähirakke hävitavaid ning patogeene ja taimekahjureid tõrjuvaid omadusi. Filipiinidel tehtud katses isoleeriti aedmaasika viljast seitse erinevat seeneliiki, millest kaks tootsid antioksidantseid ühendeid (Hipol *et al.* 2014).

Sagedasemate endofüütide poolt sünteesitavate ainevahetusproduktide hulka kuuluvad podofüllotoksiin, deoksüfüllotoksiin, kamptotetsiin, hüperitsiin ning emodiin (Nisa *et al.* 2015). Lisaks võivad endofüüdid sünteesida üksteise jaoks toksilisi ühendeid, näiteks kamptotetsiini (Kusari *et al.*, 2012). Selline olukord on võimalik vaid eeldusel, et seenel tekib esmalt antud toksiooni suhtes resistentsus ning alles seejärel on ta võimeline konkurentide vastu antud bioloogilist relva kasutama. Schulz *et al.*, (2002) kirjeldasid 12 aasta jooksul 6500 uuritud endofüüdi liigil 135 erinevat sünteesitavat sekundaarset metaboliiti, millest 51% kohta puudusid varasemad andmed (Schulz *et al.* 2002). Endofüütide biokeemiliste omaduste hulka kuulub ka nende substraadikasutus. Carroll ja Petrini (1983) tuvastasid katses okaspuudega, et endofüütsed seened eelistasid kasvada ksülaanil ja pektiinil ning ligikaudu pooled neist lagundasid tselluloosi. Lisaks olid mõned seened võimelised kasutama lipiide ja kasvama gallushappel.

Laborikatsetel endofüütidega ei pruugi kajastuda nende tegevus loomulikus elukeskkonnas. Söötmel kasvatatud liigid ei tooda tõenäoliselt biokeemilisi ühendeid, mida nad toodaksid taimes kokkupuutel mõne teise endofüüdi või patogeeniga (Kusari *et al.* 2012). Lehe-endofüütide isoleerimisel on leitud, et prooviala suurus on endofüütide arvukuse ja mitmekesisuse määramisel samuti oluline faktor. Nimelt õnnestus lehtede väiksemateks osakesteks jaotamisel isoleerida rohkem liike (Gamboa *et al.* 2002). Erinevus tuleb arvatavasti dominantsete ja allasurutud endofüütide suhtest, sest väiksemasse lehefragmenti ei pruugi söötmel teiste liikide kasvu alla suruvaid dominante sattuda.

Seega morfoloogiapõhised meetodid või söötmel kasvatamine ei sobi kõigi endofüütide tuvastamiseks, mistõttu on selliseid seeni kõige otstarbekam määrata molekulaarsete meetodite abil (Arnold 2007). Tänapäevased kõrge läbilaskevõimega sekveneerimismeetodid võimaldavad keskkonnaproovidest isoleerida korraga paljude mikroorganismide DNAd. Molekulaarsete meetodite abil saab koostada endofüütide levikukaardi ja paika panna nende kasvusubstraadi eelistused. Saadud teadmised võimaldavad tulevikus erinevate endofüütide kasvatamiseks sobivamaid tingimusi luua.

2.2 Keskkonnatingimuste mõju

Endofüütide (laias ja kitsas mõistes) levila ulatub arktilisest tundrast kuni ekvatoriaalsete vihametsadeni (Arnold ja Engelbrecht 2007, Bjorbækmo *et al.* 2010, Higgins *et al.* 2014). Muutused kliimaatilistes tingimustes nihutavad liikide geograafilisi piire suurematele laiuskraadidele ja üha kõrgemale mägedesse, kus kliimavööndid vahelduvad laiuskraadidega analoogselt (Walther *et al.* 2009). Lehe-endofüütide, nagu ka enamiku teiste organismirühmade mitmekesisus, kahaneb Rapoporti (1982) reegli kohaselt laiuskraadi suurenedes (Tedersee *et al.* 2014). Üks suur funktsionaalne seenerühm kandub siiski antud reeglist kõrvale. Nimelt on ektomükoriisaseente mitmekesisus suurim boreaalses ja parasvöötmes (Soudzilovskaia *et al.* 2017, Tedersee *et al.* 2014). Melaniseerunud rakukestaga endofüüdid asustavad segeli ektomükoriisete seentega samu kooslusi ning nende kolonisatsioonitase ületab suurematel kõrgustel arbuskulaarmükoriiseseid seeni (Pandey 2019). Ka kitsas mõistes endofüütide mitmekesisuse maksimum võib erandlikult olla ekvaatorist kõrgematel laiuskraadidel. Näiteks parasvöötme endofüüdid on troopiliste liikidega võrreldes fülogeneetiliselt varieeruvamad (Arnold ja Lutzoni 2007).

Endofüütide elukoha- ja peremehespetsiifilisuse kohta on ilmunud kinnitavaid (Hoffman ja Arnold 2008, Materatski *et al.* 2019) ja ümberlukkavaid (Higgins *et al.* 2014, Giauque ja

Hawkes 2016) uuringuid. Endofüüdikoosluste varieeruvus omavahel geograafiliselt eraldatud kuid ühesugustes kooslustes ja samades peremeesliikides on suurem kui nende varieeruvus erinevate koosluste vahel (Arnold 2007, Higgins *et al.* 2014, Saikkonen 2007, U'Ren *et al.* 2012). Glynou *et al.* (2015) ei leidnud, et geograafiline kaugus endofüüdikooslusi statistiliselt oluliselt mõjutaks. Geograafiliselt eraldatud koosluste erinevaid keskkonnatingimusi arvestamata mõjutab selliste seente varieeruvust ka nende levimiskauguse piiratus (Higgins *et al.* 2014).

Kõige rohkem mõjutavad endofüütide koosluse struktuuri temperatuur ja niiskus (Arnold ja Herre 2003, Carroll 1988, U'Ren *et al.* 2012, Zimmerman ja Vitousek 2011). Zimmerman ja Vitousek (2011) uurisid Hawaii endeemset igihaljast puittaime *Metrosideros polymorpha*, mis kasvab piirkondades, mille keskmine õhutemperatuur jääb vahemikku 10-22°C ning mille sademete hulk aastas varieerub 500-5500 mm. Antud taime lehe-endofüüdid olid mitmekesisemad madalamal asuvates niisketes taimekooslustes.

Niiskus ning temperatuur mõjutavad nii lehe- kui juure-endofüüte enamasti võrdselt. Coince *et al.* (2014) leidsid, et ka pH mõjutab juure-endofüüte lisaks mulla temperatuurile. Parasvöötmes kasvavate ning ka Eestis tavaliste liikide *Maianthemum bifolium*, *Galium odoratum*, *Mercurialis perennis* ja *Stellaria nemorum* juure-endofüütide eeskujul näidati, et seente kolonisatsiooniaseme korreleerub mulla pH gradiendiga negatiivselt (Postma *et al.* 2007). Erinevalt endofüütidest arbuskulaarse mükoriisa moodustajad enam pH väärtusel 3 ei kasvanud, kuid endofüüdid suutsid tugevalt happelist mulda taluda. Kõige mitmekesisem endofüüdikooslus esineb siiski nõrgalt happelises mullas (Rossi *et al.* 2007, Stamets ja Chilton 1983, You *et al.* 2017) ja keskmisel soolsuse gradiendil, mis on pH kõrval samuti oluline mullamikroobide mitmekesisust määrav faktor (Maciá-Vicente *et al.* 2012, You *et al.*, 2017). Göransson *et al.* (2008) leidsid, et happelistel muldadel, kus pH väärtus on alla 5, võib seente kolonisatsioonitaseme tegelik varieeruvus tuleneda hoopis keskkonna alumiiniumi kontsentratsioonist. Alumiiniumi kontsentratsioon ja mobiilsus on happelistes muldades enamasti kõrgem ning selle ioonid mõjuvad organismidele toksiliselt. Halofüütsetest taimedest on suudetud isoleerida seeni, mis kasvasid tugevalt aluselises keskkonnas, kus pH väärtus on 9 (You *et al.*, 2017). Sealjuures soolataluvus sõltus rohkem keskkonnast, kui peremeestaime liigist.

2.3 Endofüütide paljunemine

Endofüüdid (kitsas mõistes) võivad levida ja paljuneda horisontaalse või vertikaalse ülekande teel. Neist kahest on valdav horisontaalne paljunemisviis, mille all mõistetakse seente levikut eoste abil (Saikkonen *et al.* 2004). Endofüütide eoste levikuks on vajalik nende sattumine kudedest väljapoole (Carroll 1988, Rodriguez *et al.* 2009). See eeldab hüüfide või koniidide vähemalt osalist ulatumist taimeosade pinnani. Paljud lehtedes elavad endofüüdid levivad rindelises vihmametsas taimelt taimele sademete kaudu (Arnold ja Engelbrecht 2007, Herre *et al.* 2007). Sademete teel edasi kandumist kinnitab ka limaste koniidide moodustamine, mida seostatakse tihti just vihmleviga (Carroll 1988). Arnold *et al.* (2009) ning Van Bael *et al.* (2017) leidsid, et endofüüdid eelistavad lühema elueaga lehti, sest see võimaldab neil kiiremini paljuneda. Endofüüdid paljunevad vananevates ja puult langevates lehtedes ning mida lühem on lehtede eluiga, seda kiiremini peab seen ka oma elutsükli läbima (Van Bael *et al.* 2017).

Endofüüdid sisenevad taime arvatavasti ensümaatilisel, sest nad ei käivita taimes patogeenide invasioonil harilikult toimuvaid kaitsereaktsioone (Peterson *et al.* 2008). Genotüüpide omavaheline sobivus taime ja seensümbiondi vahel määrab tihti ära kooselu võimalikkuse (Saikkonen *et al.* 2004) ja taime reaktsiooni koloniseerimisele. Valkama *et al.* (2005) on kirjeldanud olukorda, kus taimede herbivooride kohalolekut tajuvad keemilisi ühendeid produtseerivad trihhoomid võivad lehele langenud seene eoseid ja nende taime tungimist siiski ka pärssida ja seda nii patogeensete seente kui endofüütide puhul. On tõenäoline, et uuritud endofüüdid ei sobinud lihtsalt genotüübiliselt antud katses kasutatud peremeestaimega. Juure-endofüüdid kasutavad levikuks mükoriisete seentega sarnaseid viise. Horisontaalsel ülekandel võivad endofüütide eosed taimejuurte omavahelisel kokkupuutel sattuda kontakti kõrvaloleva taimega ning seda nakatada (Camargo-Ricalde 2002). Lisaks on mitmel juhul näidatud, et mükoriisid ja endofüütsed seened saavad pikemate vahemaade taha levida neid söönud taim- või seentoiduliste organismidega (Fracchia *et al.* 2011, McIlveen ja Cole Jr. 1976). Horisontaalselt levivate seente suurem geneetiline mitmekesisus annab neile eelise uute peremeestaimede koloniseerimisel (Saikkonen *et al.* 2004).

Mittesuguliselt vertikaalsel teel paljunevad seened esinevad peamiselt rohttaimedel ja on sageli väga peremehespetsiifilised (Arnold 2007). Antud levimisviis on peremeestaimede kasvu ja arenguga tugevasti seotud, sest seene levikuks on vajalik taime generatiivsete organite moodustumine. Endofüütide vertikaalsel ülekandel toimub seenehüüfide tungimine taime seemnetesse (Saikkonen *et al.*, 2004). See võimaldab uue taime idanemisel seene olemasolu

juba sellistes taimekudedes, mis alles arenema hakkavad. Seensümbiont moodustab enda leviku kindlustamiseks taime vegetatiivset kasvu ja arengut soodustavaid ning herbivooride jaoks toksilisi sekundaarseid metaboliite (Saikkonen *et al.* 2004, Saikkonen *et al.* 1998). Katsetes liigiga *Triticum durum* suutsid seensümbiondiga nakatunud seemned paremini idaneda (Hubbard *et al.* 2012).

Taime generatiivsete organite moodustumisel võivad osad seni endofüüdina talitlenud seemned muutuda patogeenseks ning mõjutada taime paljunemisbioloogiat. Näiteks liigid perekonnast *Epichloë* kahjustavad taime õisikuid ja moodustavad seal paiknevate õite asemele seeneniitide põimiku, mida kutsutakse stroomaks (Saikkonen *et al.* 1998). Kui patogeen kahjustab vaid osasid õisi, jääb peremeestaimetele seemneliselt paljunemise võimalus siiski alles ning tema kohasus kannatab väiksemal määral. Liigi *Microbotryum violaceum* (varasemalt *Ustilago violacea*) eeskujul annab eoste moodustamine taime õites seentele tolmeldajate näol lisavõimaluse horisontaalsel teel paljunemiseks (Alexander 1990). Rohhtaimed sobivad oma lühikese ea, lihtsama morfoloogia ja väiksema suuruse poolest vertikaalseks ülekandeks kõige paremini (Saikkonen *et al.* 2004).

2.4 Endofüütide levik

Endofüüdid kasvavad kõiksugustes taimeorganites alustades helviksammalde tallusest (Davis ja Shaw 2008) ning lõpetades puukoore ning liblikõieliste taimede juuremügaratega (Peterson *et al.* 2008). Kui rohhtaimede seenekooslus on üle taime ühtlasemalt jaotunud ja kogu taime koloniseerib üks või paar dominant (Peterson *et al.* 2008), siis puittaimede puhul erineb maapealsete ning maa-aluste osade seenekooslus üksteisest tunduvalt nii mitmekesisuse kui dominantsete liikide poolest (Kernaghan ja Patriquin 2011). Ühena vähestest kõrgematest taimedest pole endofüüte leitud ühestki organist karulaugult (*Allium ursinum*) (Schulz *et al.* 1993). Endofüütide puudumist põhjendati karulaugu võimega väävlirikkaid ainevahetusprodukte iseseisvalt toota. Endofüütseid seeni ei esine ka veelise kasvukeskkonnaga lehtsooneostaimede *Diplaziopsidaceae* ning *Salviniaceae* sugukondadesse kuuluvatel liikidel (Lehnert *et al.* 2017).

2.4.1 Juure-endofüüdid

Taimede juured puutuvad mullas kokku paljude mikroorganismidega. Osadega neist, näiteks mügarbakterite või mükoriisete seentega, moodustavad nad sümbioosi, samas kui teistega

toimub pidev olelusvõitlus nii toitainete kui elu pärast (Chalot ja Brun 1998). Schulz (2006) kirjeldasid endofüüte, mis moodustavad taimerakus hüüfikeerde ja mis võiksid seetõttu osaleda toitainete vahetuses taimega. Endofüüdid kasutavad maa-alustesse taimeosadesse sisenemiseks tavaliselt taime juurekarvu samuti nagu mükoriisid seeneliigid (Peterson *et al.* 2008). Seentel on juurekarvadesse lihtsam sisse tungida, sest erinevalt teistest juureosadest puudub juurekarvadel kutiikula (Grierson ja Schiefelbein 2002).

Ektomükoriisaseened moodustavad nakatatud juure ümber tihedalt põimunud mantli, kus taime juurekarvade asemel hakkavad nende senist funktsiooni edaspidi täitma seene hüüfid (Chalot ja Brun 1998). Juurekarvade kui potentsiaalse elupaiga kaotamise tõttu võiksid ektomükoriisaseened olla endofüütidele tugevaks konkurendiks ning viimased juurtest üldse välja tõrjuda. Vastupidiselt oletusele on leitud, et mükoriisaseened ja endofüüdid eksisteerivad sageli koos (Girlanda *et al.* 2002, Harvais ja Hadley 1966) ning mõjutavad üksteist hoopis positiivselt. Mükoriisete seente eritised võivad endofüüte taimejuurte juurde meelitada (Tedersoo *et al.* 2009), samas kui melaniseerunud rakukestaga endofüütide sekreteeritavad ühendid soodustavad mükoriisse seene hüüfide pikenemist ja harunemist (Scervino *et al.* 2009). Tammemetsades, kus dominantseks puuliigiks oli *Quercus serrata*, esinesid mükoriisa ja endofüüdid korraga pooltel uuritud taimedest ning peapuuliigi seentega koloniseerituse aste oli keskmiselt 75% (Toju *et al.* 2013).

2.4.2 Füllospääri endofüüdid

Taimede maapealsete osade koondnimetusena võttis Edinburghi Ülikooli teadlane Frederick T. Last 1955. aastal kasutusele uue termini — füllospäär (Last 1955). Füllospäär on väliskeskkonnale avatud ning sellele avaldavad tugevat mõju nii temperatuur, UV-kiirgus kui seensümbiondi poolt vaadatuna ka vee ja toitainete kättesaadavus.

Lehed on kõige põhjalikumalt uuritud endofüütide elukeskkond. Endofüüdid satuvad taime lehtedesse mitmel moel. Lehele langenud seeneosad võivad lehe pinnal oodata idanemiseks sobivaid niiskustingimusi, et siis apressori abil lehte tungida (Van Bael *et al.* 2017). Apessoriks nimetatakse seeneniidi tipus tekkivat moodustist, mis võimaldab seene kinnitumist peremeesorganismile ning millest areneb läbi epidermi peremehe kudesse tungiv väljakasv (Kalamees *et al.* 2000). Sarnast sisenemisviisi kasutavad patogeensed või lehepinna karmide keskkonnatingimuste eest põgenemise eesmärgil ka mitmed epifüütsed seened (Van Bael *et al.* 2017). Harvem toimub endofüütide sisenemine taime õhulõhede või näärmekarvade kaudu (Van Bael *et al.* 2017, Bailey *et al.* 2009). Neist viimast kinnitavad kakaopuu lehe

näärmekarvadest leitud perekonda *Trichoderma* kuuluvad endofüüdid (Bailey *et al.* 2009). Arvatavasti eelistavad endofüüdid elada lehtedes, mille koed pole väga paksud, sest see võimaldab üheaegselt taime kergemat nakatamist (Arnold ja Herre 2003) ja hüüfide harunemist lehes (Van Bael *et al.* 2017). Antud uurimustest järeldeb, et ka varjulehtedes elab endofüüte rohkem kui valguslehtedes, sest lehelaba paksus suureneb valguskiirguse tugevnedes (Ashton ja Berlyn 1992).

Lehe kudede paksus ja endofüüdi kolonisatsioon võivad sõltuda lehe vanusest. Noorte kasvamisjärgus lehtede koed alles arenevad, mistõttu need on õhemad ning nakatuvad endofüütidega kergemini. Kuigi Coley ja Aide (1991) leidsid, et noored kasvamisjärgus lehed kannatavad herbivooride ja patogeenide rünnaku all 5-100 korda suuremat kahju kui täiskasvanud lehed, ei ole mükoloogid lehe vanuse mõjus endofüütide arvukusele üksmeelele jõudnud. Arnoldi ja Herre (2003) katses kakaopuuga (*Theobroma cacao*) ei suudetud tõestada taimelehe endofüütidega koloniseerituse sõltuvust selle vanusest. Okaspuu *Pinus strobus* erineva vanusega okastes joonistus lehe vanuseline mõju endofüütidele jällegi tugevalt välja (Deckert ja Peterson 2000). Samal oksal olevates kaheaastastes okastes oli kolonisatsiooniate ligikaudu poole suurem kui alles esimest aastat esinevatel okastel, milles endofüüdid peaaegu puudusid. Vanemate okaste kõrgemat koloniseeritust põhjendati antud uurimuses lehe füüsiliste kaitsebarjäärade nõrgenemisega. Vähem endofüütseid ja epifüütseid lehtedes kasvavaid seeneliike leidub ka linnakeskkonnas, kus on suurem õhusaaste ning toitainete ja raskemetallide üleküllus (Jumpponen ja Jones 2009).

Lehti katab pindmine vettpidav kiht, mida kutsutakse kutiikulaks. Kuigi taimeperekondade *Banksia* ja *Olearia* liikide lehtede kutiikulast on isoleeritud perekonda *Vizella* kuuluvaid kottseeni (Petrini 1991), ei eelista seened üldjuhul seda biopolümeerset kasvusubstraati. Kutiikulal kasvavate seente hüüfid ulatuvad seetõttu tõenäoliselt ka lehe toitainerikkamatesse alumistesse kihtidesse. Kutiikula all asuv epidermis on endofüütide jaoks juba sobivam elukeskkond, kuid ka selles kattekoekihis elavad seened peavad taluma rohkemal või vähemal määral ultraviolettkiirgust. UV-B kiirgus on hävitava toimega paljudele elusorganismidele kaasa arvatud seentele. Hughes *et al.* (2003) isoleerisid Antarktikas kasvanud lehthelviksamblast *Cephaloziella varians* erinevate seente hüüfid ning näitasid nende eeskujul ultraviolettkiirguse tugevalt pärssivat mõju endofüütide kasvule. Võiks oletada, et UV-kiirgusele eksponeeritud keskkonnas elavate endofüütide näol on tegemist valdavalt melaniseerunud rakukestaga seente rühma kuuluvate organismidega, sest melaniin adsorbeerib ultraviolettkiirgust, vähendades selle kahjulikku mõju (Singaravelan *et al.* 2008).

Melaniseerunud rakukestaga seened esinevad aga valdavalt taimede juurtes, mitte selle maapealsetes osades, kus taim otsese kiirgusega rohkem kokku puutub (Scervino *et al.* 2009, Kernaghan ja Patriquin 2011). Endofüütide eksponeerimisele ultraviolettkiirgusele võib nende melaniini sisaldus siiski muutuda. Seeneliigi *Aspergillus niger* uurimisel selgus, et kõrbelistes paikades mullas elavate seente koniidide melaniini kontsentratsioon oli kuni kolm korda kõrgem niiskemas ja varjulisemas paigas kasvavate seente omast ning tegemist oli adaptiivse tunnusega (Singaravelan *et al.* 2008). Samuti suurenes Hughes *et al.* (2003) katses helviksammaldest isoleeritud liigiga *Phoma herbarum* seensümbiondi tumeda pigmendi osakaal rakukestas. Kuigi mainitud katses kasutatud seente melaniini tootmine mõnevõrra suurenes, vastasid puhaskultuuris kasvatatud ultraviolettkiirgusele eksponeeritud seened sellele valdavalt hoopis sügavamale kasvusubstraati kasvamisega. Petrini (1991) püstitatud hüpoteesi kohaselt on osad epifüütsed seened fakultatiivsed endofüüdid. Antud hüpoteesi toetavad tulemused nii Hughes *et al.* (2003) katsest Antarktikas kasvavate liikidega kui mitmed kuumakõrbete endofüüdikooslused. Nimelt esineb kõrbetaimede lehtedes tihti tüüpilisi epifüütseid perekondi näiteks *Phoma*, *Chaetomium* ja *Aureobasidium* (Arnold, 2007). Stabiilsemate elutingimuste ja sobivama kasvusubstraadi tõttu esineb lehe-endofüüte kõige rohkem taime apoplastis ja mesofüllirakkude vahelises ruumis (Clay 2001, Giraldo ja Valent 2013).

Lisaks endofüüdikoosluse varieeruvusele lehekudedes sõltub seente mitmekesisus ka nende ruumilisest paiknemisest lehe piires. Arnoldi (2007) avaldatud artiklis kirjeldati, kuidas nii lehelabas kui ka leherootsus esinesid hõimkonda kottseened kuuluvad endofüüdid, kuid nende dominantsed liigid olid mõlemas isemoodi. Okaspuudel mõjutas endofüüdikooslust lehe piirkonnaga võrsel määral lehe pikkus (Deckert ja Peterson 2000). Lühikeste jäikade okastega harilikul ebatsuugal (*Pseudotsuga menziesii*), palsammulul (*Abies balsamea*) ning punasel ja mustal kuusel (vastavalt *Picea rubens* ning *Picea mariana*) asus endofüütide maksimaalne tihedus okaste alusel. Valge männi *Pinus strobus* okkad olid seevastu pikemad ja elastsemad ning liibusid vihmasajul üksteise vastu. Tõenäoliselt kandis vihm endofüütide eosed lehtede proksimaalsest piirkonnast ära, sest nende maksimum asus antud liigil okaste tipmises osas. Kõige endofüüdivaesem oli valge männi okaste keskmine osa.

2.5 Endofüütide suhe peremeestaimega

Rodriguez *et al.* (2009) jaotavad kitsas mõistes endofüütsed seened peremehespetsiifilisuse alusel kahte suurde rühma: kitsa peremeheringiga tungalteralisteks (inglise k. *clavicipitaceous*)

ning peremehe valiku suhtes vabamateks mitte-tungalteralisteks (inglise k. *nonclavicipitaceous*). Peremehespetsiifiline endofüüdirühm esineb enamasti kõrreliste (*Poaceae*) või lõikheinaliste (*Cyperaceae*) võsudes ja risoomis ning koloniseerib taime laiaulatuslikult (Bischoff ja White 2005). Tegemist on omavahel fülogeneetiliselt lähedalt seotud seentega (Clay ja Schardl 2002).

Fülogeneetiliselt lähedalt seotud tungalteralised on valdavalt obligaatset biotroofid (Clay ja Schardl 2002), kuid mitte-tungalteralised moodustavad suure polüfüleetilise rühma, millel esineb enamasti lai peremeesringi. Mitte-tungalteralistel endofüütidel eristatakse üksteisest funktsionaalsuse alusel (Rodriguez *et al.* 2009). Esimesse gruppi kuuluvad nn. süsteemsed endofüüdid, kes asustavad nii taime maapealseid kui ka maa-aluseid osi, kuid kelle liigiline mitmekesisus on madalam kui teistel rühmadel. Teine ja kolmas rühm on spetsialiseerunud vastavalt taime maapealsetele või maa-alustele organitele. Maapealseid taimeosi koloniseerivad endofüüdid on asukohatundlikud ja nende mitmekesisus võib tugevasti varieeruda isegi sama lehe erinevas otsas (Arnold 2007, Deckert ja Paterson 2000). Seetõttu peetakse maapealsetele taimeorganitele spetsialiseerunud seeni kõige mitmekesisemaks endofüüdirühmaks.

2.5.1 Mutualism

Endofüüdid vajavad eluks peremeestaimelt saadud orgaanilisi süsinikuühendeid ning vett ja kaitsvat elukeskkonda sarnaselt teistelegi taimedega sümbioosis elavatele seentele (Schulz 2006). Peale selle pakuvad taimed endofüütidele paremat levimisvõimalust (Rodriguez *et al.* 2009). Paljude endofüütsete seente negatiivne mõju peremeestaimele on vaatamata nende põlvnemisele haigustekitajatest (Carroll 1988, Selosse *et al.* 2018) või saprotroofidest seentest (Promputtha *et al.* 2007, Selosse *et al.* 2018) aja jooksul vähenenud ning asendunud taime jaoks positiivse toimega. Endofüütide positiivsest mõjust taimele võib esile tuua kaitse herbivooride vastu ning põua- ja raskemetallide taluvuse.

2.5.1.1 Herbivooride vastane kaitse

Endofüütide kõige olulisem ja sagedasem positiivne mõju taimele on peremehe kaitsmine patogeenide ja herbivooride eest. Endofüütide kaitsevõime aluseks on nende ainevahetusproduktid, mis on sageli toksilised või mikroobide ja selgrootute kasvu pidurdava toimega (Carroll 1988). Rohhtaimes leiduvad seensümbiondid suudavad lisaks taimetoidulistele putukatele hukutada isegi suuri kariloomi (Saikkonen *et al.* 1998). Teise

organismirühma vastu toodetavad toksiinid on tavalised ka taimedes. Endofüütide metaboliidid toimivad aga kasvu pärssivalt või hukutavalt isegi teistele patogeensetele seentele (Luo *et al.* 2015).

Herbivooride ja patogeenide jaoks mürgiste ühendite produtseerimine on näide otsesest kaitsesest taimtoiduliste kahjurite vastu. Endofüütsed seened võivad peremehe elumust ja herbivoore lisaks sellele ka kaudselt mõjutada. Kaudsel kaitsel soodustavad endofüüdid peremeestaime signaliseerivate lenduvate orgaaniliste ühendite eritumist, mis meelitab kohale kahjuritest toituvaid organisme ja hüperparasiite nii taime maapealsetes kui maa-alustes osades (Fuchs ja Krauss 2018). Tibbets ja Faeth (1999) kirjeldasid, et mõned liigid meelitasid herbivooride antagonistide asemel kohale hoopis herbivoore ennast ja vähendasid seetõttu taime vastupanuvõimet. Teine kaudse kaitses näide pärineb Wilsoni (1995b) uurimusest seente ja pähklestadega. Nimelt kasvasid tamme lehe-endofüütide hüüfid pähklestade poolt lehele moodustatud pähkade rakkudesse, põhjustades nende surma. Paha rakkude suuremise tagajärjel hukkus ka parasiitne putukas. Antud juhul endofüütsed seened putukat ennast ei nakatanud, kuid endofüütsete seente seas esineb ka putukaparasiite. Ühed sellistest on perekonda *Metarhizium* kuuluvad seened. Nende uurimisel on leitud, et lisaks putuka nakatamisele transpordivad antud seened hüüfide kaudu peremeestaime ka putuka suuremisel loomast saadud lämmastikku (Behie *et al.*, 2012). Lisaks sugukonda *Clavicipitaceae* kuuluvale perekonnale *Metarhizium* sisaldab palju entomopatogeenseid endofüüdiliike ka sugukond *Cordycipitaceae* (Maharachchikumbura *et al.* 2016, Zhang 2006)

2.5.1.2 Raskemetallide taluvus

Endofüüdid võivad suurendada peremeestaime taluvust raskemetallidest üle-küllastunud keskkonnas. Juure-endofüüdid suudavad kelaatida risosfääris asuvaid raskemetalle või siduda need rakkude sees ohutumasse vormi (Yamaji *et al.* 2016). Melaniseerunud rakukestaga endofüüdid kasutavad raskemetallide ionide sidumiseks melaniini või teisi antioksidantseid ühendeid (Ban *et al.* 2012, Yamaji *et al.* 2016). Sarnaseid mehhanisme on leitud ka mitmetel erikoidset- ja ektomükoriisat moodustavatel sümbiontsetel seeneliikidel (Colpaert *et al.* 2011, Martino *et al.* 2000). Endofüüdi *Exophiala pisciphila* kuivmassist võib plii kontsentratsioon moodustada isegi üle 20% (Zhang *et al.* 2008). Raskemetallidest on kirjeldatud lisaks pliile veel tsingi, nikli, vase, kroomi ning kaadmiumi tolerantsust (Choo *et al.* 2015, Yamaji *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2008). Raskemetallide ohtliku mõju vähendamiseks koos võib reostunud alal suurendada endofüütidega nakatunud peremeestaime kasv ja toitainete, näiteks kaaliumi,

kättesaadavus (Yamaji *et al.* 2016). Metallioonide mittereaktiivsesse vormi sidumine ja taime kasvu soodustamine teevad endofüütidest olulise abivahendi raskemetallide reostuse all kannatavate alade järkjärgulisel puhastamisel.

2.5.1.3 Kuuma-ja põuastressi taluvus

Endofüütidel on kirjeldatud taimede kuuma- ja põuataluvust tõstvat toimet. Seensümbiondi mõju väljendub taime põuastressiga seotud geenide ekspressiooni reguleerimises (Sherameti *et al.* 2008). Endofüüt aitab taimel stressile kiiremini reageerida, hoides nende antioksidatiivse võimekuse glutatiooni-askorbaadi tsüklit aktiveerides kõrgena (Waller *et al.* 2005). Vulkaaniliselt aktiivsetes paikades kasvavatel taimedel võimaldasid endofüüdid perekonnast *Curvularia* üle elada lühiajalist kõrget (50 °C) mulla temperatuuri, kusjuures 65 °C juures suutsid ellu jääda vaid sümbiondiga taimed (Redman *et al.* 2002). Juure-endofüüdid parandasid põuatingimustes kasvanud *Triticum durum* teise põlvkonna seemikute ellujäävust ning taime saagikust (Hubbard *et al.* 2013).

Võõralt peremeestaimelt isoleeritud melaniseerunud rakukestaga seeneliigid võivad põua korral juurte biomassi tõsta kohati üle 90%, (Li *et al.* 2018, Rodriguez *et al.* 2008). Katses Põhja-Ameerikas kasvava kõrrelise ning seeneperekonda *Neotyphodium* kuuluva liigiga leiti, et endofüütidega nakatatud taimede võsude biomass oli põua korral seensümbiondita taimedest 14% võrra kõrgem ning juurte oma kuni 24% kõrgem (Kannadan ja Rudgers 2008). Niisiis mõjutavad maapealsetes osades elavad endofüüdid põua korral biomassi poolest rohkem taime maa-aluseid osi. Endofüütide poolt nakatatud taimede kasvu taastumine korduvast põuast võib olla rohkem pärsitud kui sümbiondita taimedel (Cheplick 2004). See tähendab, et endofüütsed seened annavad põua tingimustes taimedele eelise vaid teatud olukorras. Tundub, et endofüüdid on põuatolerantsust soodustavad sellisel juhul, kui taime looduslikuks kasvukohaks on ariidsed ökosüsteemid või endofüüt ise on sealt isoleeritud (Sherameti *et al.* 2008, Rodriguez *et al.* 2008).

Kasutatud metoodika

3. Uuringuala

Tartu Ülikooli botaanikaaed on rajatud 1803. aastal ning paikneb oma praeguses asukohas alates 1806. aastast. See katab endise bastioni vallil olevat 3,5 hektari suurust maa-ala, kus pole säilinud ei looduslikke muldi ega taimekooslusi. Botaanikaaia avamaa taimekogud koosnevad peamiselt parasvöötmes kasvavatest liikidest ning troopikas ja lähistroopikas kasvavaid taimi võib leida 2006. aastal renoveeritud kasvuhoonetest. Kasvuhooned on jagatud neljaks osakonnaks: palmihoone, troopikahoone, lähistroopikahoone ning sukulentide ruum. Palmihoone taimeala uuendati põhjalikumalt 2014. aastal. Tartu Ülikooli botaanikaaia taimekogu sisaldab 2016. aasta seisuga 10353 erinevat taimeliiki või sorti. Neist vanim on ligikaudu 260 aasta vanune olga lehis *Larix gmelinii var olgensis*.⁵

4. Proovide kogumine

Kogusin lehe- ja juureproove kokku 150 Tartu Ülikooli Botaanikaaias kasvavalt puittaimelt katteseemne- ja paljasseemnetaimede seast, millest 38 paiknesid kasvuhoonetes ning 112 välitingimustes. Neist 40 on Eesti pärismaised puittaimed (Kukk 1999 järgi). Sõsarrühma esindajaks troopilistele soontaimeliikidele valisin sirp-kõverjala *Cyrtomium falcatum* ning välitingimustes kasvavatele soontaimedele mõõk-astelsõnajala *Polystichum munitum*, mis kuuluvad sõnajalgtaimede hulka. Võtsin kollektsioonidest erinevate liikide puhul valimisse võimalusel mitu esindajat. Näiteks harilik tamm (*Quercus robur*), harilik jugapuu (*Taxus baccata*) ja harilik pöök (*Fagus sylvatica*) esinevad valimis vähemalt kolme eraldi peremeestaimena. Avamaa valimis oli seega kokkuvõtvalt 40 esindajaga 22 erinevast liigist kohalikke puittaimi ning 71 esindajaga 61 liigist erinevaid võõramaiseid puittaimi. Iga proov sai märgistatud peremeestaime liigi ning korjamise kuupäevaga. Avamaa proovide koordinaadid on võetud Tartu Ülikooli Botaanikaaia poolt 2017.aastal koostatud kollektsioonide nimestikust või andmete puudumisel botaanikaaia interaktiivselt veebikaardilt⁶.

Lehtede korjamisel valisin ühelt taimelt 2 m³ piires asunud viis väliste haigustunnusteta lehte. Okaspuudelt korjasin enamasti kümme või enam okast, et hiljem analüüsi minevate leheproovide kogus oleks võrdne. Korjatud lehed kogusin õhku läbilaskvatesse paber-kottidesse. Juureproovide kogumisel otsisin elus juuri ning kontrollisin nende õigele

taimele kuuluvust taimeni kulgevate pea- ja külgsuurte abil. Juured said kogutud pealt suletavatesse plastikkottidesse. Pesin juureproovid voolava kraanivee all ning lõikasin nende teise või kolmanda järgu juured kümneks 2 cm pikkuseks jupiks. Leheproovide ettevalmistamisel kemikaalidega töötlemiseks lõikasin igast lehest 1 cm diameetriga ketta ning okaspuude puhul paigutasin okkad selliselt, et ka neist oleks võimalik sama suur tükk lõigata. Proovide läbikuivamise vältimiseks, mis oleks takistanud nende lõikamist, töötlesin kõiki proove maksimaalselt 2,5 päeva jooksul. Proovide pindsteriliseerimisel toiminis järgnevalt: loksutasin proove ühe minuti jooksul 96% etanooli lahuses ning hoidsin neid seejärel ühe minuti 0,75% naatriumhüpokloriti (NaOCl) lahuses. Viimasena puhastasin proovid minuti jooksul voolava kraanivee all lahusest ning paigutasin need säilitamiseks ja edasiseks töötlemiseks guanidiin tiotsüanaati sisaldavatesse QIAGEN PowerBead tuubidesse. Töötlust naatriumhüpokloriti ja 96% etanooli lahusega on näidatud usaldusväärse endofüütide pindsteriliseerimise meetodina (Schulz *et al.* 1993). Erinevate omadustega proove samal meetodil pindsteriliseerides võib siiski jääda võimalus, et nende steriliseerimine ei olnud täielik ning alles jäi ka proovide pinnal paiknenud mikroorganismide DNAd. Sellegipoolest aitab pindsteriliseerimine kõrvalise DNA hulka tunduvalt vähendada (Burgdorf *et al.* 2014). Teadmata asjaoludel tekkis tuubides mitmete keemiliselt töödeldud lehe- ja juureproovide peale hallituskiht. Saastuse välistamiseks edasisest analüüsist võtsin erineva koloonia morfoloogiaga hallitustest DNA proovid ning eemaldasin seejärel nähtava hallituse steriilsete pintsettide ja vatipulkadega.

5. Molekulaarsed analüüsid

Endofüütide DNA isoleerimine toimus PowerSoil DNA isoleerimise komplekti abil tootja juhendi alusel (QIAGEN, www.mobio.com). Paigutasin proovidega tuubid purustajasse, et saada kätte lehe- ja juuretükide sees olnud mikroorganismide DNA ning toiminis juhendi viiendas etapis järgmiselt: 5 minutit segamist vorteksil, 10 minutit proovide hoidmist 60°C juures ning seejärel taas 10 minutit segamist vorteksil.

Seeneliikide identifitseerimiseks kasutatakse universaalseks triipkoodiks määratud ribosomaalse RNA geeni mittekodeerivat ITS regiooni (Schoch *et al.* 2012). Lisaks seente DNAlle võivad ITS piirkonna kasutamisel üles amplifitseeruda ka taimede geenijärjestused, mille kogus proovis antud juhul seene oma kordades ületaks. Taime DNA amplifitseerimise vältimiseks on loodud mitmeid seenespetsiifilisi ITS praimereid (Nilsson *et al.* 2019).

Kasutasin rDNA ITS piirkonna amplifitseerimiseks päripidise praimerina seenespetsiifilist taimi välistavat praimerit ITS1catta (5'-cgaccwgcggarggatcatta-3', Tedersoo ja Anslan, publitseerimata) ning äraspidise praimerina eukarüootide suhtes universaalset praimerit ITS4ngsUNI (5'-cctccscttantdatatgc-3', Tedersoo ja Lindahl 2016). Neist viimane ei suuda küll tuvastada rühma *Archaeorhizomycetes*, kuid selle puhul on näidatud head kriitiliste seenerühmade kaasamist (Tedersoo *et al.* 2017). Praimeritele olid lisatud ka molekulaarsed indeksid, mis võimaldasid välja selgitada, millised järjestused missuguse proovi juure kuulusid. Proovid jaotati nelja raamatukogu vahel ning kokku oli kasutuses 75 erinevate indeksitega praimeripaari.

Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) jaoks valmistatud 25 µl segu sisaldas 5 µl FIREPoI DNA polümeraasi (Solis Biodyne, Tartu, Eesti), 0,5 µl mõlemat 20 µM praimerit, 18 µl destilleeritud vett ning 1 µl DNAd. Kasutasin termotsükleris järgnevat programmi: DNA ahela denaturatsioon 15 minutit 95 °C juures, leheproovidel alustuseks 30 ning juureproovidel 25 tsüklit, mis koosnes 30 sekundist denaturatsioonist 95 °C, 30 sekundist praimerite seondumisest 55 °C juures ning 1 minutist protsessi pikendamisest 72 °C juures. Protsessi lõpule viimiseks hoidsin proove peale tsükleid veel 10 minutit samal temperatuuril. Tõstsin vajadusel DNA kontsentratsiooni või tsüklite arvu maksimaalselt 4 µl ja 38 tsüklini. Geelelektroforeesil kasutasin 1% geeli, mis koosnes 100 ml 1x TBE puhvrast ja 1 g agarosist, ning visualiseerisin proovid UV-valguses. Peale PCR ja geelelektroforeesi pipeteerisin kõik ühel plaadil olnud proovid üksteisega kokku ning kontrollisin lahuse DNA sisaldust Qubit fluoromeetriga. Puhastasin seejärel produktid FavorPrep PCR Clean-up mini komplekti abil ning need saadeti Pacific Biosciences SEQUEL platvormil sekveneerimiseks (Rhoads ja Au 2015) Oslo Ülikooli sekveneerimiskeskusesse (Blindern NO.0316, Oslo, Norra). PacBio SMRT meetod on vähemtundlik GC-rikaste järjestuste suhtes ning võimaldab korruga sekveneerida pikemaid lõike (Reuter *et al.* 2015).

6. Järjestuste töötlemine

Töötasin saadud sekventsidega edasi kasutades PipeCraft tarkvara (Anslan *et al.* 2017), mis koondab kokku vabavaralised sekventside analüüsimiseks mõeldud tööriistad. Esmalt filtreerisin vsearch tööriista abil (Rognes *et al.* 2014-2015) välja kvaliteetsed DNA järjestused. Kasutasin järgnevaid sätteid: truncual=19, maxee=1, maxee rate=5, minlength =150, maxambig= 0, qmax=100. Järgmisena komplekteerisin mothur tööriistaga (Schloss *et al.* 2009)

sekventsids kokku proovidega, kust need pärinesid. Kimäärsed järjestused filtreerisin välja 97% sarnasuse alusel tööriistaga vsearch⁷. Seente määramisel kasutatava ITS geenipiirkonna eraldamiseks kasutasin esmalt unikaalsete järjestuste loomiseks taas mothur tööriista (Schloss *et al.* 2009) ning seejärel tööriista ITSx (Bengtsson-Palme *et al.* 2013). Klasterdasin proovid tööriistaga CD-HIT (Fu *et al.* 2012) (Threshold=0,98; Min length=10; Memory=400, Min size=2, Length cutoff=0, Threads=1, Storing=0, Algorithm=0) ning genereerisin saadud operatsiooniliste taksonoomiliste ühikutega (OTU; inglise k. *Operational Taxonomic Unit*) tabeli. Viimasena lisasin tabelile juurde BLAST+ otsingutööriista abil (Camacho *et al.* 2009) sekventsides taksonoomilised määrangud, kasutades eraldi sätteid (task=blastn, strands=plus, threads=1, e value=0,001, word size=7, reward=1, penalty=-1, gap open=1, run BLAST databases= Together (no. of databases=1), gap extend=2) ning UNITE andmebaasist saadud referentsjärjestusi (UNITE Community 2019, versioon 7.2). Viisin andmestikus sisse vajalikud korrektuurid ning eemaldasid hallitustelt võetud DNA proovidega kattuvad järjestused.

Eesti seenestiku kohta ei leidunud võrdluseks sobivat ülevaadet. Seente päritolu teada saamiseks koostasid uue andmestiku kohalike seentega ning võrdlesid seda lehe-ja juureproovidest saadud tulemustega. Lisasin uude seente andmekogusse mükoloogia töörühma Eestist kogutud mullaproovidest kõrge läbilaskevõimega meetodite abil saadud sekventsids ning teigin UNITE andmebaasist Eestist, Soomest ja Rootsist kogutud seente kohta väljavõtte. Leian, et antud viis võimaldab maksimaalselt kaasata Eestist erinevatest elupaikadest (>1500 ala) isoleeritud seeni, kuigi mitte kõik andmebaasist välja loetud seened ei pruugi kohalikud olla. Kasutasid uue koostatud andmekogu referentsjärjestusi BLAST+ otsingul (Camacho *et al.* 2009) oma järjestuste vastu ning valisin tulemused välja 99% sarnasuse alusel.

7. Statistilised analüüsid

Sekveneerimisel saadud OTU-de hulka mõjutab nii seente DNA lõplik kogus selle eraldamisel ja amplifitseerimisel kui väiksemal määral ka indeksite sobivus ning proovi taksonoomiline koosseis. Neist viimane sõltub erinevate seente biokeemilistest ja füüsikalistest eripäradest, mis võivad molekulaarseid analüüse segada. (Nilsson *et al.* 2019)

Seente OTU-de oodatava ning tegeliku arvu eristamine analüüsil eemaldab proovide kogumisest tingitud varieeruvuse liikide esinemissageduses (Brocklehurst 2015). Võtsin seetõttu liigilise mitmekesisuse mõõduna kasutusele proovides esinenud OTU-de rikkuse jäägi regressioonist sekventsides arvu ruutjuurega (OTU_{RES}; Tedersoo *et al.* 2014 järgi). Nende

kasutamine sõltumatu tunnusena võimaldas määrata, millised faktorid mõjutavad elurikkust arvestades sekventsitude arvu kumulatiivset mõju. Hindasin seeneliikide mitmekesisuse sõltuvust proovi tüübist, proovi võtmise kohast ning peremeestaimede mükoriisatüübist. Aias kogutud proovide puhul lisasin analüüsi lisaks peremeestaimede päritolu. Kasvuhoonetes ühtegi kohalikku puittaimet ei esinenud, mistõttu neid analüüsi ei kaasatud.

Seente päritolu seost nende kasvukohaga mõõtsin Fisheri täpse testi abil. Jätsin valikusse liigid, mis esinesid vähemalt kümnes erinevas proovis. Eristasin kasvukohaeelistuste arvutamisel lehtedest ja juurtest isoleeritud seeni. Juure-endofüüti oli testis 28 ning lehe-endofüüti 91 (Lisa 1). Positiivseks väärtuseks sai iga liigi puhul proovide arv, milles see esines, ning negatiivseks väärtuseks proovide arv, kus seda ei esinenud. Univariaatseteks statistilisteks analüüsideks ning Fisheri testiks kasutasin Statistica 8.0 (Weiß 2007) programmi.

Peremeestaimede fülogeneetilise mõju arvestamiseks konstrueeriti arvutiprogrammi Phylomatic⁸ (versioon 3) abil Zanne *et al.* (2014) taimede fülogeneesipuu topoloogia põhjal käesolevas töös analüüsitud taimeliikide normaliseeritud fülogramm (Lisa 2) ning arvutati taksonite lahknemisajad. Zanne *et al.* (2014) taimede fülogeneetilise andmestiku koostamisel on kasutatud fossiilseid andmeid ning seitset GenBank andmebaasis kättesaadavat geenipiirkonda. Taimeliigid, mida andmebaasis ei leidunud, asendati puu konstrueerimiseks teise samasse perekonda kuuluva liigiga. Juhul kui andmestikust puudus ka perekond, valiti esindajaks samasse sugukonda kuuluv fülogeneetiliselt võimalikult lähedase perekonna liik. Rakendustarkvara R (R Development Core Team 2014) *cophenetic*⁹ funktsiooni kasutades arvutati välja kofeneetilised kaugused, mis võimaldavad eristada taimede fülogeneetilise päritolu mõju seente mitmekesisusele (Remm *et al.* 2012). Arvutasin R paketi „*vegan*“ (Oksanen *et al.* 2014) funktsiooni *pcnm*¹⁰ abil naabusmaatriksi peakoordinaadid ning nende vahelise Eukleidilise kauguse. Saadud PCNM vektorid (Borcard ja Legendre 2002) iseloomustavad taksonite kaugust paaride kaupa nende ühisest esivanemast (Cardona *et al.* 2013). Fülogrammi aitas konstrueerida Saleh Rahimlou. Kasutasin neid eelnevalt välja arvutatud muutujaid korrelatsioonimaatriksi koostamisel ning üldises lineaarses analüüsis. Peremeestaimede ruumilise paiknemise mõju ja ruumilise autokorrelatsiooni hindamiseks konverteerisin koordinaatide-põhised kaugused samuti ruumivektoriteks

Seente taksonirikkuse OTU_{RES} analüüsimiseks kasutasin taas programmi Statistica 8.0, milles viisin läbi üldise lineaarse analüüsi, kus kasutasin sõltumatute kategooriliste muutujatena proovi tüüpi (lehe või juureproov), peremeestaimede kasvukohta (aed või kasvuhoone),

peremeestaimede mükoriisatüüpi (ektomükoriisa või teised mükoriisavormid) ning pidevate muutujatena korrelatsioonimaatriksi põhjal välja valitud fülogeneesi- ja ruumivektoreid (Lisa 3). Olen teadlik, et kasvuhoone ja avamaa võrdluses kasutatavad proovid on pseudoreplitseeritud, kuna tegu on vaid ühe kasvuhoone ja ühe avamaaga. Tulemused pole seetõttu rakendatavad teistele süsteemidele.

Seente koosluse analüüsimisel seostasin OTU-de hulga proovide kogumise koordinaatidega ning leidsin R funktsioone *rda* ning *ordistep* kasutades sobiva permutatsiooni testimise mudeli. Kaasasin statistiliselt olulised ruumivektorid koos teiste oluliste faktoritega edasisse analüüsi, mida teostasin programmiga Permanova+ (versioon 1.0.6)¹¹, milles teisendasin ohtrustabeli Hellingeri distantstil põhinevaks sarnasusmaatriksiks. Hellingeri teisendus põhineb ruutjuur-funktsioonil ning see võimaldab analüüsi kaasata ka vähemarvukaid liike (Legendre ja Gallagher 2001). Parima mudeli saamiseks kasutasin andmemaatriksi kauguspõhist lineaarset modelleerimist (DistLM, valikud: Selection Procedure= forward, Selection Criterion= R^2 , permutations= 999). Statistiliselt olulisi tunnuseid kasutasin edasi korrigeeritud determinatsioonikordaja seleksioonipõhisel mudeli koostamisel. Parima mudeli kirjeldusvõimega ning statistilise olulisuse alusel valisin välja tunnused, mida kaasata permutatsioonilisse multivariaatanalüüsi (PERMANOVA). Kasutasin samu muutujaid ka kauguspõhisel liiasusanalüüsil (dbRDA). Faktoriaalsetest tunnustest olid analüüsisse kaasatud peremeestaimede kasvukoht, mükoriisatüüp ning päritolu. Jätsin multivariaatanalüüsil andmestikust välja OTU-d, mida esines vaid ühes proovis. Leheproovidest jäi analüüsi 472 OTU-t ning juureproovidest 241 OTU-t. Statistilistel analüüsidel on kasutatud 95% usaldusnivood.

Ordinatsioonigraafiku koostamiseks valisin fülogeneesivektoritest välja statistiliselt olulised faktorid. Kuna oluliste fülogeneesivektorite hulk juure-ja leheproovides oli erinev, otsustasin dbRDA analüüsi kaasata viis kõige suurema pseudo-F väärtusega vektorit.

8. Proovide andmebaasistamine ja andmestiku publitseerimine

Juure-ja leheproovidest saadud seente DNA nukleotiidsete järjestuste ning nendega seotud andmete haldamine toimus PlutoF platvormil (Abarenkov *et al.* 2010b; <https://plutof.ut.ee>). Lõin PlutoFis projekti „Tartu Botanical Garden Endophyte project“, kuhu sisestasin proovialade ja proovide kohta kogutud andmed ning nendega seotud geenijärjestused. Sisestasin valitud esindussekventsid andmebaasi nii, et kõik igas proovis leitud OTU-d oleksid

esindatud vähemalt ühe geenijärjestusega. Kasutasin OTU-de ja nende esindussekventside saamiseks järgnevat meetodikat. Kõikide järjestuste klasterdamiseks 99% alusel liitsin esmalt Python käsu abil kokku programmist PipeCraft ITS regiooni eraldamisel saadud Fasta formaadis sekventside faili ning nende asukohta proovides sisaldava groups formaadis faili. Käsu tulemusena tekkis iga proovi kohta eraldi vaid sinna kuuluvate geenijärjestustega fail. Viisin seejärel läbi kõigis nendes failides olevate sekventside eraldi klasterdamise 99% sarnasuse alusel, milleks kasutasin Python keskkonnas toimivat skripti (Sten Anslani järgi), kus klasterdamine toimus Usearch (Edgar 2010, versioon 8) UPARSE algoritmi alusel.

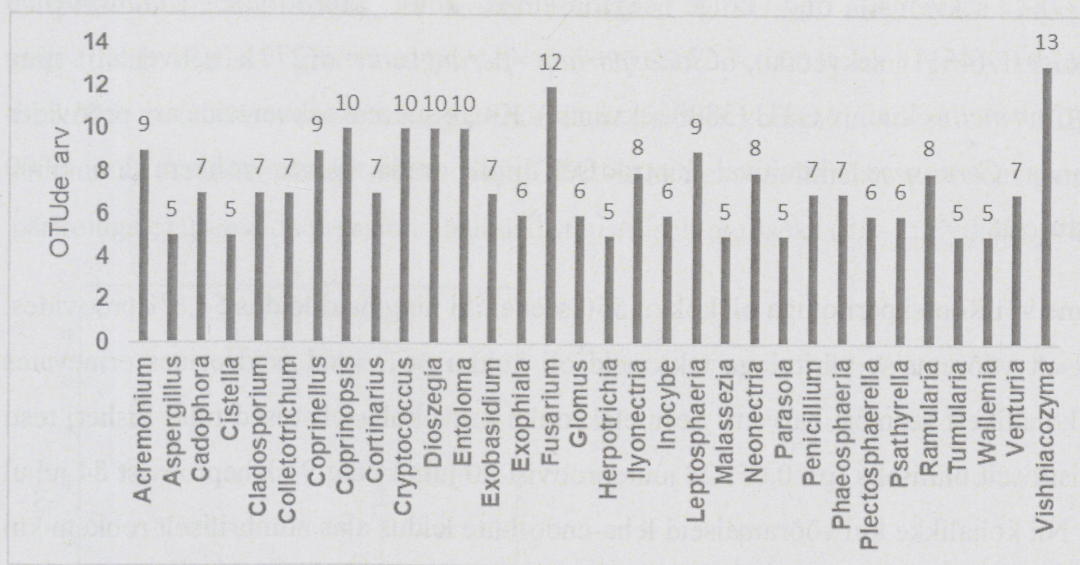
Järgmisena lisasin PlutoF töölaual klasterdamisel saadud esindussekventsidele UNITE liigihüpoteeside (inglise k. *Species Hypothesis*, SH) püsiidentifikaatoreid kasutades määrangud. Geenijärjestuste määramiseks saab PlutoF töölaua analüüside laboris kasutada massBLASTer SH matching meetodit (Abarenkov *et al.* 2010b). UNITE andmebaas (Abarenkov *et al.* 2010a) sisaldab nii avalikes INSDC (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*) kui ka töörühmade andmebaasides olevaid seente ITS geenijärjestusi. Perekonna või alamperekonna tasemele klasterdatud sekventside seas toimub järjestuste edasine klasterdamine ning jagamine liigihüpoteesideks (Kõljalg *et al.* 2013). Iga liigihüpotees saab endale püsiva unikaalse juurdepääsukoodi (inglise k. *digital object identifier*, DOI), mis võimaldab liiki teadustöodes ja andmebaasides viidata ka juhul, kui taksonil puudub ladinakeelne liigi nimi. Masinloetavate liigihüpoteeside kasutamine võimaldab vältida olukorda, kus organismi taksonoomiline kuuluvus määratakse valesti või samasse taksonisse kuuluvaid organisme lisatakse andmebaasi erineva nimetuse all. See on ka heaks lahenduseks uute liikide avastamisel keskkonnaproovidest, sest antud seenetaksoneid ei ole tihtipeale teistest morfoloogiliste tunnuste põhjal võimalik eristada, kuid liigihüpoteeside lisamisel saab nende mitmekesisust ja arvukust siiski kaardistada.

Seni kirjeldatud seeneliike on ligikaudu 100 000, kuid nende koguarv võib oletuste kohaselt küündida kuue miljoni liigini (Taylor *et al.* 2014, Hibbett *et al.* 2011). Viimase uurimuse kohaselt (Hawksworth ja Lücking 2017) jääb seente liigirikkus pigem vahemikku 2,2-3,8 miljonit liiki. Isegi sellisel juhul moodustab kirjeldatud seente arv nende tegelikust liigilisest mitmekesisusest maksimaalselt 8% (Hawksworth ja Lücking 2017). Liigihüpoteesi kasutamine DOIga jätab võimaluse liigikirjelduse lisamiseks tulevikus, kui leitakse isendid, kelle põhjal seda koostada, ning võimaldab seejärel andmete automaatset uuendamist. Liigihüpoteesid võimaldavad tulevikus kommunikeerida ka nimedeta või segase taksonoomiaga seenetaksoneid (Kõljalg *et al.* 2016).

Sobiva liigihüpoteesi vaste leidnud proovid publitseerisin eraldiseisva andmekogumina¹² GBIF (Global Biodiversity Information *Facility*) andmeportaalis¹³. Publitseerimiseks valisin 7973-st sekventsist välja 5649 järjestust. Välja valitud 5449 sekvensi leidsid 2% liikidevahelist distantssi kasutades UNITE liigihüpoteeside seast vaste. Liigihüpoteeside lisamisel sorteeriti välja ligikaudu 25% sekventsist. Neist 7% kohta puudus andmebaasis liigihüpotees, mis tähendab, et 568 leitud OTU sekvensi võivad kuuluda kas seni kirjeldamata liikidele või need lihtsalt puuduvad UNITE andmebaasist.

Tulemused

Botaanikaia puittaimede juure-ja leheproovidest õnnestus kokku isoleerida 1552 rRNA geeni ITS järjestuse põhised eukarüootide taksonit (OTU-t), millest 1325 kuulus seeneriigi esindajatele. Proovide hallitamist põhjustanud seente ning duplikaatide eemaldamisel jäi andmestikku 1211 seenetaksonit. Neist on hõimkonna tasemeni määratud 1070 taksonit, millest sagedaseimad olid kottseened (664), kandseened (351) ning krohmseened (28). Perekonnani on määratud 728 (Joonis 1) ning liigini 369 OTU-t. BLAST+ otsingul said endale vastava liigihüpoteesi 1056 OTU-t. Liigihüpoteesita jäid 68 erinevat OTU-t, mis võivad kuuluda nii seni avastamata kohalike liikide kui ka võõrliikide hulka. Liigihüpoteesita liike käsitlesin analüüsidest potentsiaalsete võõrliikidena.



Joonis 1. Sagedaseimad proovides esinenud seeneperekonnad. Toodud on perekonnad, kus esines vähemalt viis erinevat liigi tasemel taksonit.

Proovides esines kokku 442 lagundajat, 91 sümbiotroofi (mükoriisaseened või liheniseerunud seened), 189 taimepatogeeni ning 13 mükoparasiiti. Mükoriisaseened jaotusid järgmiselt: ektomükoriisseid OTU-sid oli 72 ning arbuskulaarset mükoriisat moodustavaid OTU-sid perekonna tasemele määratuna 11. Informatsioon puudus kokku 453 OTU eluviisi kohta. Ainult juureproovides leidis 384 ning ainult lehtedes 694 seeneliiki. Mõlemas proovitüübis esines kokku 133 seeneliiki.

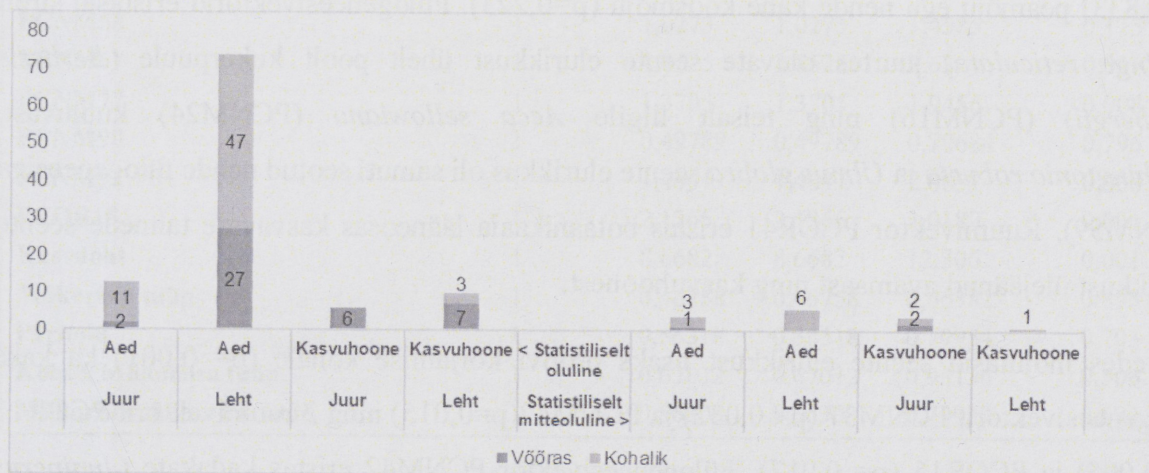
Kaks kõige mitmekesisema lehe-endofüütide kooslusega leheproovi pärinesid puuliikidelt *Ulmus americana* ja *Pinus koraiensis* vastavalt 96 ja 79 OTU-ga. Kolmandat kohta jagasid 78 OTU-ga *Ulmus laevis* ja *Magnolia kobus*. Kasvuhoones asustasid 63 erinevat seeneliiki troopilise *Beaucarnea recurvata* isendi lehti. Juure-endofüütide poolest oli kasvuhoones 62 OTU-ga kõige liigirikkam *Phyllostachys viridiglaucescens*. Avamaal pärinesid 70 juuri asustavat seeneliiki hariliku vahtra (*Acer platanoides*) ning 68 hariliku pöõgi (*Fagus sylvatica*) juureproovidest.

Juurtes oli kõige arvukam ja proovides kõige sagedasem taimepatogeen *Dactylonectria macrodidyma*, kes esines kokku 101 erineva taime juurtes 112682 sekventsist kokku 24165 sekventsina. Rohkem kui 40 proovis ja üle 10000 sekventsina esinesid juurtes ka saprotroofne *Harzia velata* ning fütopatogeenid perekonnast *Ilyonectria* ning *Plectosphaerella*. Lehtedes (kokku 87783 sekventsi) olid kõige sagedasemad kolm saprotroofi: *Cladosporium cladosporioides* (4611 sekventsi), *Cladosporium perangustum* (2771 sekventsi) ning perekonda *Coprinellus* kuuluv OTU (3890 sekventsi). Kõige suurem sekventside arv proovides oli perekonda *Cercospora* kuuluval biotroofselt liigil, mida esines rohkem kui 6000 geenijärjestusena.

Eesti, Soome või Rootsi päritoluga oli kokku 550 seeneliiki ning neid leidis 54,8% proovides. Potentsiaalselt võõramaise päritoluga taksonid oli kokku 661, kuid neid esines erinevates proovides kohalikest seentest harvem. Seentetaksonite kasvukohaeelistused tulid Fisheri testi põhjal statistiliselt oluliseks ($p < 0,05$) 28 juureproovist 20 juhul ning 91 leheproovist 84 juhul (Joonis 2). Nii kohalikke kui võõramaiseid lehe-endofüüte leidis aias numbriliselt rohkem kui kasvuhoones. Kuus võõramaist juure-endofüüti kaheksast testitust eelistasid kasvada kasvuhoones, samas kui ükski kohalik juure-endofüüt statistiliselt oluliselt kasvada ei eelistanud.

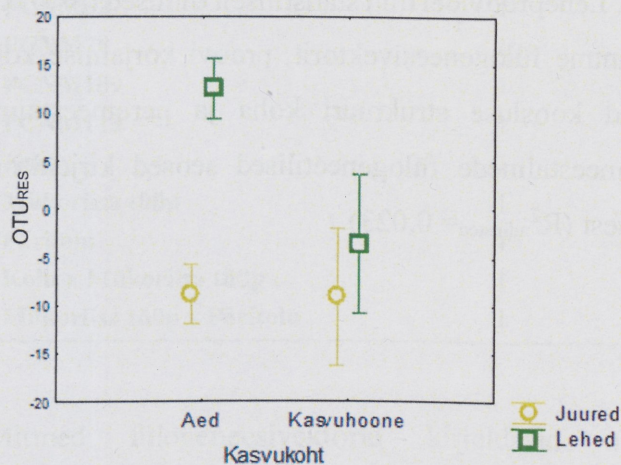
Oluliselt erinevate OTU-de põhjal arvasin, et potentsiaalselt võõramaiste ja kohalike seenetaksonite eelistus kasvukoha suhtes on erinev. Juureproovides leidunud kohalikud ja

potentsiaalselt võõrad OTU-d tegid vahet kasvuhuones ja aias kasvavatel peremeestaimedel ($p < 0,001$) ning potentsiaalsete võõraste seente OTU-de osakaal oli kasvuhuone ja avamaa taimedel juure- ja leheproovides erinev ($p = 0,03$). Juureproovides oli kohalikke seeni rohkem aias ning eksootilisi kasvuhuones. Võõraid lehe-endofüüte esines erinevalt juure-endofüütidest rohkem aias.



Joonis 2. Fisheri testi tulemused. Vasakule jäävad statistiliselt olulised kasvukohaelistustega endofüütide OTU-d ning paremale OTU-d, millel kasvukohaelistus puudus. Toodud on 20 juurtest ja 84 lehtedest isoleeritud kõige sagedasemat endofüüdi OTU-t (>10 proovis).

Dispersioonianalüüs näitas, et seente elurikkust (OTU_{RES}) mõjutavad kõigis proovides statistiliselt oluliselt proovi tüübi ($df=1$; $F=22,805$; $p < 0,001$) ning proovivõtukohta ($df=1$; $F=8,379$; $p=0,004$) peamõju ning nende kahe faktori koosmõju ($df=1$; $F=7,813$; $p=0,005$) (Joonis 3). Avamaalt korjatud proovide OTU-de suhtelise mitmekesisuse seos peremeestaimede päritoluga ei tulnud dispersioonianalüüsil statistiliselt oluliseks ($df=1$; $F=0,40$; $p=0,530$).



Joonis 3. Kasvukohta ja proovi tüübi mõju OTU-de suhtelisele mitmekesisusele (OTU_{RES}). Vurrud tähistavad standardviga.

Kuna proovitüübi mõju oli tugev ja see interakteerus ka proovivõtukohtaga, viisin eraldi analüüsi läbi juurtele ja lehtedele. Juurtes mõjutasid seente elurikkust viis fülogeneesivektorit: PCNM16 ($p=0,004$), PCNM24 ($p=0,001$), PCNM28 ($p=0,001$), PCNM46 ($p=0,001$), PCNM59 ($p=0,002$). Lisaks mõjutas juurtes seente elurikkust OTU_{RES} statistiliselt oluliselt ruumivektor PCOR41 ($p=0,002$). Juurte puhul ei suudetud tõestada koha ($p=0,666$) ja mükoriisatüübi ($p=0,833$) peamõju ega nende kahe koosmõju ($p=0,223$). Fülogeneesivektorid eristasid sireli (*Syringa reticulata*) juurtes olevate seente elurikkust ühelt poolt kukerpuule (*Berberis thunbergii*) (PCNM16) ning teisalt liigile *Acca sellowiana* (PCNM24) kuuluvast. *Washingtonia robusta* ja *Ulmus glabra* seente elurikkus oli samuti seotud nende fülogeneesiga (PCNM59). Ruumivektor PCOR41 eristas botaanikaaija lääneosas kasvavate taimede seente elurikkust ülejäänud avamaast ning kasvuhoonest.

Lehtedes mõjutasid seente elurikkust lisaks proovi korjamise kohale ($p= 0,001$) ka kaks fülogeneesivektorit PCNM37 ($p= 0,032$) ja PCNM42($p=0,015$) ning 2 ruumivektorit PCOR11 ($p=0,005$) ja PCOR15 ($p= 0,017$). Fülogeneesivektor PCNM42 eristas kadakate (*Juniperus communis*) lehtedes leiduvate seente elurikkust pajude omast (*Salix*). Ruumivektor PCOR11 eristas kiviktaimla äärset Euroopa taimede osakonda, mis asub botaanikaaija keskosast kirdes ning ruumivektor PCOR15 botaanikaaija läänekülge. Peremeestaime mükoriisatüüp ega mükoriisatüübi ja proovi korjamise koha koosmõju statistiliselt oluliseks ei osutunud ($p= 0,793$; $p= 0,091$).

Permanova analüüs näitas, et juureproovide seenekooslusi seletasid statistiliselt olulised tunnused OTU_{RES} ($p=0,001$), kuus fülogeneesivektorit, üks koordinaatvektor ning proovivõtukoht (Tabel 2). Peremeestaimede fülogeneetilised seosed kirjeldasid 5,2% kogu andmestiku varieeruvusest ($R^2_{\text{adjusted}}= 0,052$). Leheproovidel olid statistiliselt olulised ($p< 0,05$) OTU-de ning sekvensside arv, OTU_{RES}, kümme fülogeneesivektorit, proovi korjamise koht (Tabel 3). Statistiliselt oluliselt mõjutasid koosluse struktuuri koha ja peremeestaime mükoriisatüübi koosmõju ($p=0,002$). Peremeestaimede fülogeneetilised seosed kirjeldasid 2,3% kogu koosluse andmestiku varieeruvusest ($R^2_{\text{adjusted}}= 0,023$).

Tabel 2. Juureproovide seenekoosluse analüüsi tulemused

	Df	SS	MS	Pseudo-F	P-väärtus
OTU _{RES}	1	2,2703	2,2703	3,2232	0,001
PCNM10	1	3,3807	3,3807	4,7995	0,001
PCNM2	1	1,8708	1,8708	2,656	0,002
PCNM31	1	1,4547	1,4547	2,0653	0,007
PCNM42	1	0,67644	0,67644	0,96033	0,515
PCNM58	1	1,0273	1,0273	1,4585	0,125
PCNM67	1	1,8525	1,8525	2,63	0,001
PCNM77	1	1,3705	1,3705	1,9456	0,008
PCNM90	1	0,49789	0,49789	0,70684	0,796
PCNM91	1	1,4691	1,4691	2,0857	0,008
PCOR18	1	2,1265	2,1265	3,0189	0,001
Kasvuoh	1	8,6682	8,6682	12,306	0,001
Mükoriisa tüüp	1	0,46758	0,46758	0,66382	0,893
Päritolu	1	0,56318	0,56318	0,79954	0,703
Koht x Mükoriisa tüüp	1	0,67012	0,67012	0,95136	0,506
Mükoriisa tüüp x Päritolu	1	0,56303	0,56303	0,79932	0,692

Tabel 3. Leheproovide seenekoosluse analüüsi tulemused

	Df	SS	MS	Pseudo-F	P-väärtus
OTU	1	6,0143	6,0143	8,2101	0,001
Sekventsids	1	1,5386	1,5386	2,1003	0,001
OTU _{RES}	1	1,9761	1,9761	2,6975	0,001
PCNM2	1	1,5951	1,5951	2,1775	0,001
PCNM3	1	1,3105	1,3105	1,789	0,002
PCNM24	1	1,2109	1,2109	1,653	0,005
PCNM30	1	1,1065	1,1065	1,5105	0,023
PCNM35	1	1,119	1,119	1,5276	0,012
PCNM47	1	1,1778	1,1778	1,6078	0,007
PCNM62	1	1,212	1,212	1,6545	0,01
PCNM78	1	1,5068	1,5068	2,0569	0,002
PCNM109	1	1,2169	1,2169	1,6612	0,004
PCNM113	1	1,1368	1,1368	1,5519	0,01
Koht	1	6,0399	6,0399	8,2451	0,001
Mükoriisa tüüp	1	0,95562	0,95562	1,3045	0,071
Päritolu	1	0,85518	0,85518	1,1674	0,167
Koht x Mükoriisa tüüp	1	1,2346	1,2346	1,6854	0,002
Mükoriisa tüüp x Päritolu	1	0,79264	0,79264	1,082	0,275

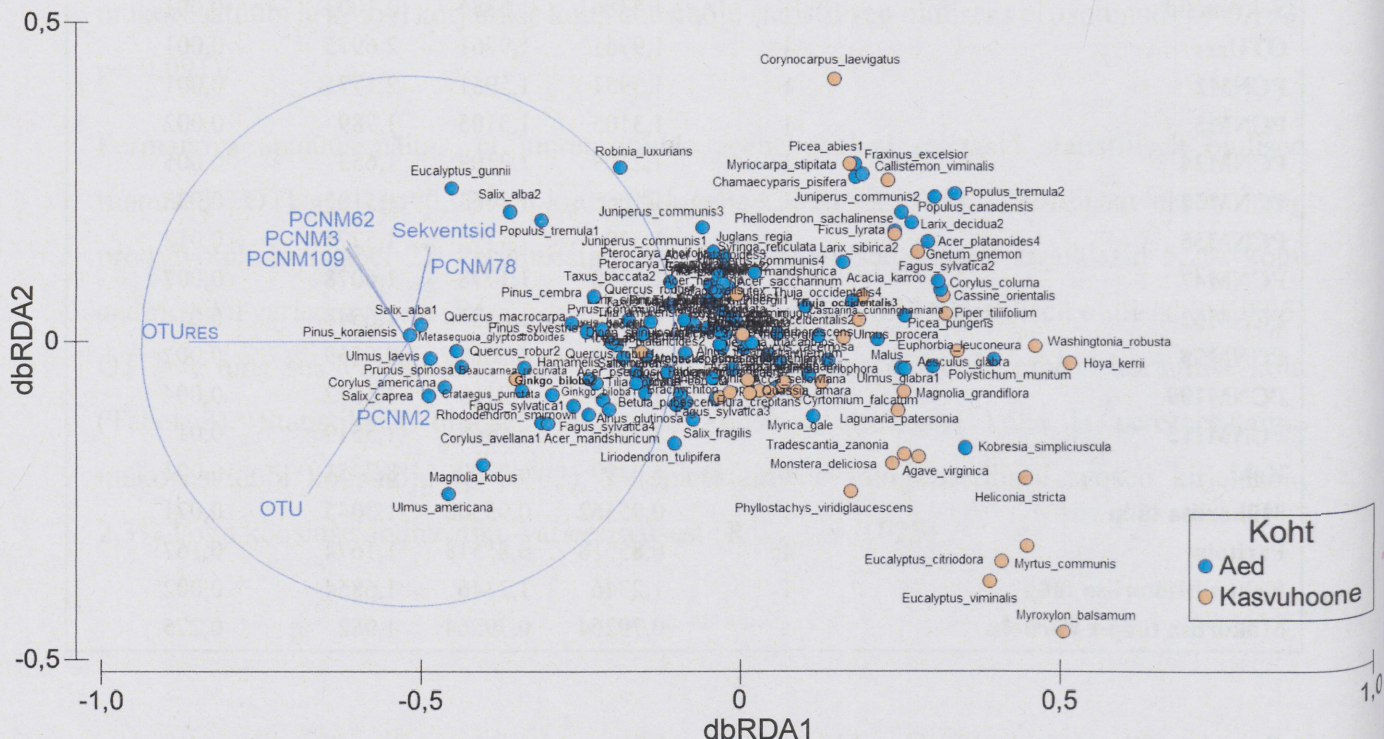
Mitmed fülogeneesivektorid kirjeldasid olulise osa seenekoosluse struktuurist. Fülogeneesivektor PCNM10 eristab teistest okaspuudest lehiseid ja nulgu. Koordinaatvektor PCOR18 teeb statistiliselt oluliselt vahet palmihoone ning lähistroopika kasvahoone taimede

juurte seenekooslusel. Fülogeneesivektor PCNM2 eristab okaspuid ning kaselisi. PCNM91 teeb vahtratel vahet perekonnasiseselt: *A. negundo* ja *A. manschuricum* vs. teised vahtraliigid. PCNM31 eristab *Hura crepitans* ja *Tamarix laxa* seenekooslusi. Fülogeneesivektor PCNM2 eristab lehtede seenekoosluse poolest samuti okaspuid ning kaselisi ning fülogeneesivektor PCNM78 leppasid ning sarapuid.

Genereerisin dbRDA analüüsil ordinatsioonigraafikud lehtede ja juurte endofüüdikoosluste kompositsiooni kirjeldamiseks. Leheproovide parameetrite alusel koostatud x-telg (RDA1) iseloomustab taimede kasvukohta (Joonis 4): kasvuhoonetaimed asuvad valdavalt graafiku paremas osas ning õuetaimed vasakul. Eraldi väikese rühma moodustuvad neli kasvuhooones kasvanud taime: eukalüptid *E. citridora* ja *E. viminalis*, *Myrtus communis* ning *Myroxylon balsamum*. Nende nelja ühiseks tunnuseks on eeterlike õlide produtseerimine (Khan ja Abourashed 2011). Eeterlikel õlidel on kirjeldatud seente kasvule negatiivset toimet (Pattnaik *et al.* 1996), mistõttu tingis antud taimede seenekoosluse struktuuri varieeruvuse tõenäoliselt just see omadus. Teistest eraldi paigutunud palmihoones kasvava liigi *Corynocarpus laevigatus* lehes leidis vaid üks võõramaine entomopatogeenne liik *Isaria*.

Botaanikaiaia lehe-endofüüdid

Sarnasus: Hellingeri kaugus



Joonis 4. Lehe-endofüütide dbRDA analüüsi tulemused. Ordinatsioonigraafiku vektorid märgivad erinevate parameetrite mõju suunda.

Arutelu

Maaailmas on vastusena muutustele kliimaatilistes tingimustes täheldatud kohalike liikide geograafiliste piiride ja populatsioonidünaamika muutumist (Walther *et al.* 2009). Ka botaanikaaedades juba pikaajaliselt eksisteerinud taimekolleksioonidest pärinevad liigid võivad sobivate tingimuste puhul invasiivseks muutuda. Eesti kontekstis on ohtlikud näiteks lõuna poolt pärit taimed, mis on kohaliku kliima soojenemisel või niiskustingimuste muutumisel juba uute oludega kohastunud ning saavad kiiresti edasi levida (Hulme 2011). On võimalik, et välismaiste taimedega botaanikaaeda toodud seemned on latentses olekus ning kliima soojenemisel kujutavad need meie kohalikule seenestikule suurt ohtu. Võõrliikidel on kohaliku ökosüsteemi jaoks mitmeid negatiivseid mõjusid. Neist võib välja tuua pärismaisete liikide nišside hõivamise ning nii kooslustesisesese kui kooslustevahelise liigirikkuse vähenemise, hübriidiseerumise tõttu pärismaisete liikide genofondi muutmise ja uute haiguste ning kahjurite introductseerimise (Eek ja Kukk 2013). Ainuüksi Tallinna botaanikaaia arboreetumis kasvab 1425 erinevat puittaimede taksonit (Sander 2007). Avamaal kasvavaid võõrtaimeliike võiks Eestis hinnanguliselt olla ligikaudu 4000 (Eek ja Kukk 2013). Mujalt sisse toodud taimeliigid kannavad erinevaid potentsiaalseid seensümbionte või patogeene, kes kohalikku kooslusse sattudes võivad seda ühes või teises suunas mõjutada. Botaanikaaiad on seda ohtu püüdnud vältida, kasutades istutamiseks kohapeal idandatud ja ettekasvatatud taimi¹.

Tõstatasin oma uurimistöös küsimuse, kas kohalikud peremeestaimed on seente liigirikkuselt eksootilistest taimedest üle ning kas botaanikaaia puittaimede juurtes ja lehtedes esinevad arvukamalt kohalikud või eksootilised seeneliigid. Tartu Ülikooli Botaanikaaia puittaimede juurtest ja lehtedest õnnestus pärast nende pindsteriliseerimist isoleerida 1211 liigitasemel seenetaksonit ehk OTU-t. Neist endofüütseid liike kitsamas mõistes esines kokku 454, millest vaid ühte on eelnevalt kirjeldatud rangelt endofüütse eluvormina. Peaaegu niisama palju oli proovides ka saprotroofseid liike, kes esinesid parasjagu endofüütse eluvormis või asustasid surnud kudesid. Nii endofüüdid kui ka saprotroofid kuuluvad valdavalt hõimkonda kottseened, mis haakub Terhonen *et al.* (2018) kirjeldusega taimekudedes kõige sagedamini esinevatest seenerühmadest. Hõimkonda *Ascomycota* kuuluvad endofüüdid ja saprotroofid lagundavad suhkruid ja tselluloosi vähesel määral (Van der Wal *et al.* 2012). Taimekudedes esines ka hõimkonda kandseened (*Basidiomycota*) kuuluvaid saprotroofe, kes tarbivad rakukestades olevat ligniini (Dighton 2007). Isoleeritud seenekooslus koosnes seega enamasti endofüütidest ning erinevaid taimekomponente tarbivatest lagundajatest. Fütopatogeenseid OTU-sid, kellest mitmed endofüüdid põlvnevad ning kes samuti teatud eluetapis taimele negatiivset mõju

avaldamata eksisteerida võivad, oli küll liigiliselt vähem (189), kuid see-eest olid nad sekventsides hulga poolest ühed arvukaimad. Proovides rohkem kui 24000 sekventsina esinenud *Dactylonectria macrodidyma*, tekitab haigusi nii viinamarjal, oliivil kui ka avokaadol (Malapi-Wight *et al.* 2015). Kuna peremeestaimede valikus neist kolmest ühtegi taime ei esinenud, võib järeldada, et antud seen põhjustab haigusi vaid kindlatel peremeesliikide juurtes ning uuritud puittaimedega käitus see kas sümbiondina, kommensaalina või nõrga sümptomite-vaba patogeenina. Kuigi näiteks 14 proovis üle 4000 sekventsina esinenud *Colletotrichum gloeosporioides* on samuti üks laiema levikuga haigustekitajaid troopilistel viljadel (Siddiqui ja Ali 2014), siis Promputtha *et al.* (2007) hinnangul võivad mõned tema populatsioonid olla hoopis endofüüdid või saprotroofid. Antud olukord ilmestab hästi seda, kui keeruline on tegelikult liikide täpne kategoriseerimine interaktsiooni tüübi põhjal ning näitab, et nende suhe peremeestaimega sõltub veel paljudest muudest faktoritest lisaks organismi liigile.

Testisin avamaakollektsiooni puhul seenekoosluste kompositsiooni sõltuvust peremeestaimede päritolust. Päritolult 22 kohaliku ja 61 võõra puittaimeliigi seenestiku mitmekesisus ei erinenud üksteisest statistiliselt oluliselt. Kõige seenetaksonite poolest rikkamate lehtedega võõrliigid olid Ida-Aasiast või Põhja-Ameerika parasvöötmeist pärinevad puud, millest kuus olid esindatud esimese kümne kõige suurema OTU-de arvuga taimes. Kõige kõrgema seente elurikkusega juurtega võõrliigid olid taas sarnase päritoluga, eranditeks Lääne- ja Kesk-Euroopale pärismaised *Pinus cembra* ning *Fagus sylvatica*. Sellest järeldub, et endofüütsete seente liigirikkuselt suudavad meie kohalike puudega konkureerida samast kliimavöötmeist pärit võõrliigid.

Dispersioonianalüüsil selgus, et seente elurikkus (OTU_{RES}) oli aias lehtedes (ent mitte juurtes) tunduvalt kõrgem kui kasvuhuones. Nii kohalikud kui ka võõramaised lehe-endofüüdid eelistasid valdavalt koloniseerida avamaakollektsioonis kasvavaid taimi. Arvatavasti on kasvuhuones mitmekesisust ja arvukust piiravaks teguriks selle isoleeritus väliskeskkonnast, mis kahandab tunduvalt seal ringlevate seenete hulk. Lehe-endofüütide eoste levimisel on suur roll tuulel ja vihasajul (Arnold ja Engelbrecht 2007, Carroll 1988), mis kasvuhuones puuduvad ning mis seetõttu nende uute taimede asustamist pärsib. Juure-endofüütide mitmekesisus püsis kasvuhuones ja avamaakollektsioonis pigem võrdsena. Kuna ka kasvuhuonetesse on vaja vahepeal uut mulda juurde tuua, võib juure-endofüütide mitmekesisus vahepeal multšiga kaasa tulnud uute liikide arvelt taas tõusta.

Selgus, et lehe-endofüütide mitmekesisus ja arvukus oli suurem kui juure-endofüütidel. Ainult lehtedes esines 694 erinevat liiki, samas kui vaid juurtes kasvanud seeni oli kokku 384. Vaadeldavad tulemused lähevad vastuollu Wearn *et al.* (2012) uuringuga, kus peremeestaimede juurte endofüüdikooslus oli nende lehtede omast liigirikkam. Samas oli antud katses tegemist rohttaimedega, mille juured on teistsuguste omadustega. Puittaimede juurte seenekoosluse liigirikkust võis mõjutada ka juureproovidest purustamisel kätte saadud DNA hulk. Võimalik, et juureproove oleks tulnud kauem ja tugevamini purustada, et kätte saada maksimaalselt paljude endofüütide DNA.

Seente päritolu tuvastamiseks kasutasin Eestist võetud mullaproovidest sekveneeritud ning Eestist, Rootsist ja Soomest andmebaasi kantud seente DNA-põhist määramist, mis oli kõige kiirem ning põhjalikum moodus kaasata otsingusse nii viljakehi kui nähtamatut liigilist mitmekesisust. Kalamees *et al.* (2000) tõi välja, et 2000. aastaks oli Eestis registreeritud ligikaudu 4000 liiki seeni, munasseeni ja limakuid. Seente DNA-põhine määramine polnud siis veel valdav ning tänaseks on Eesti seeneliikide arv kõvasti kasvanud. Kui näiteks Eestis leiduvatest ektomükoriissetest trühvlitest *Tuber* oli ülevaates ainsana viidatud Fedor Bucholtzi 1917. aasta leiule Saaremaal, siis täpselt saja aasta pärast oli molekulaarsete andmete põhjal Eestist teada juba 22 trühvliliiki (Ilves 2017). Aasta hiljem oli neid nimistusse lisandunud veel 16 (publitseerimata). Selline olukord tekitab küsimuse, kui palju me enda kohalikest mulla- ja juureseentest üldse teame ning kuidas teha vahet neil seentel, kes on siin nähtamatult olnud aastasadu ning kes uute võõraste taimeliikidega alles hiljuti on sisse toodud.

Tartu Ülikooli Botaanikaaias esines kohalikke seeni nii siinsetel kui ka eksootilistel peremeestaime liikidel. Peremeestaime päritolu ei olnud statistilises analüüsis oluline. Vastupidiselt eeldatule ei olnud pärismaistel puittaimedel ei olnud võõrliikidega võrreldes mitmekesisem endofüüdikooslus. Krivtsov *et al.* (2003) leidsid Šotimaa botaanikaaias seente viljakehi uurides, et eksootilist puuliiki *Pseudotsuga menziesii* koloniseerisid paljud kohalikku päritolu ektomükoriissed seened. Nii tundus see olevat ka Tartu Ülikooli Botaanikaaias. Näiteks Eestis leiduv saprotroof *Harzia velata* koloniseeris ühtviisi arvukalt nii kohalikku sarapuuliiki *Corylus avellana* kui võõraid sarapuid *Corylus americana* ning *Corylus cornuta*. Ektomükoriisne kohalik liik perekonnast *Trichophaea* ei eristanud samuti pärismaiseid leht- ja okaspuid ega eksootilisi taimi. Kasvuhoonetes kasvanud 38 taime seas oli vaid üheksa puittaime, mille leheproovides ei esinenud ühtegi Eesti päritolu OTU-t. Eesti seeneliigid olid kokkuvõttes suhteliselt võrdselt jaotunud nii pärismaiste kui võõraste peremeestaimede vahel.

Vähemalt perekonna tasemeni määratud krohmseened olid kõik arbuskulaarse mükoriisa moodustajad, kuid ükski neist ei olnud ITS geeniregiooni põhjal Eestist varem leitud. Ribosomaalse RNA 18S subühikut kodeeriva geeni põhjal on leitud, et valdav enamus krohmseeni on väga laia levilaga (Davison *et al.* 2015) Ektomükoriisat moodustavatest seenetaksonitest oli 71,8% Eestist varem teada. Huvitaval kombel tuvastati 20 ektomükoriisat moodustava seenetaksonit eranditult taimede lehtedes, ent igal juhul vähem kui viies erinevas proovis. Tekib küsimus, kas tegemist võiks olla välise saastega või on tõesti mõned ektomükoriissed seened võimelised elama endofüütselt ka taimellehtedes. Wearn *et al.* (2012) on leidnud, et rohttaimede puhul on juurtes ja lehtedes kasvavate endofüütide liigiline koosseis väga erinev ning üldjuhul ei kattu. Kuna ühtegi kirjeldust lehtedes elavatest mükoriisaseentest ei leidu, on arvatavasti tegemist saastustega. Miks esines juuresümbiontide oletatav saastus just leheproovides, jääb samuti mõistmatuks. Võib oletada, et tegu on tuulega levinud seeneeostega, mida ei õnnestunud pindsteriliseemise käigus eemaldada.

Juurtes ja lehtedes mõjutasid seente elurikkust mitmed fülogeneesi- ja ruumivektorid. Nii juurte kui ka lehtede puhul olid olulised ruumivektorid, mis eristasid botaanikaaiia läänenurka ülejäänud alast. Botaanikaaiia läänenurgas kasvavad peamiselt Põhja-Ameerika päritolu taimeliigid. Lisaks eristas üks ruumivektoritest Euroopa taimede osakonnas paiknevate liikide seente elurikkust. Fülogeneesivektorite mõjust joonistusid välja kaks suuremat teistest erinevat rühma - kaselised ja okaspuud. Kaseliste puhul on näidatud, et need seovad endaga kindlaid ektomükoriisaseeni (Tedersoo *et al.* 2012). On tõenäoline, et kaseliste juuri võivad asustada ka teised spetsiifilised seenerühmad. Okaspuutaimede juure-endofüütide kooslus võib olla mõjutatud okaspuude produtseeritavatest vaikudest ja nende kujundatavast happelisemast keskkonnast (Phillips ja Croteau 1999). Kuna okaspuutaimed on valdavalt ektomükoriissed, võib klasterdumine toimuda ka mükoriisa tüübist tuleneva varieeruvuse tõttu.

Ordinatsioonigraafikul oli näha, et lehtede endofüütsete seente kompositsioonilt sarnanesid üksteisele troopilised eeterlikke õlisid sisaldavate lehtedega taimeliigid. Kui taimed produtseerivad ise antibiootilise toimega sekundaarseid ainevahetusprodukte, peavad endofüütsed seened suutma neid toksilisi ühendeid taluda. See eeldab peremeestaimel spetsialiseerumist või toksiinide talumise arengut (Kusari *et al.* 2012). Arvatavasti tulenevad erinevused seeneliikide kompositsioonis just antud taimede biokeemilistest omadustest. Juurtest eraldatud seente koosluse struktuuri puhul on selgelt vaadeldav okaspuude klasterdumine eraldi rühma. Juure-endofüütide koosseis erineb okaspuudes valdavalt nende ektomükoriisuse tõttu. On leitud, et mükoriisa kolonisatsiooniate ja endofüütide

kolonisatsiooniate on mõnel juhul omavahel negatiivselt korreleerunud (Wearn *et al.* 2012). See tähendab, et juhul, kui okaspuu juured on ektomükoriisete seentega juba sümbioosi moodustanud, pärivad need taime asustamist endofüütide poolt (Yamamoto *et al.* 2014). Samuti võib okaspuude puhul silmatorkav erinevus peituda puu toodetavas terpeene sisaldavas vaikaines (Phillips ja Croteau 1999) või happelises varises. Keskkonna pH muutus kajastub seenestiku struktuuris. Minu andmetest ei selgunud mükoriisatüübi mingit mõju puudega seotud seente kooslustele.

Tõestasin oma uurimistöö tulemustega, et Tartu Ülikooli Botaanikaaias leidub lisaks pärismaistele ja eksootilistele taimedele külg külje kõrval ja samas peremehes kasvamas nii kohalikke kui ka võõraid seeneliike. Kasvuhoonetes olevate seeneliikide levik on piiratud, kuid avamaa kollektsioonides kasvavatele taimeliikidele ja nende seensümbiontidele tuleks rohkem tähelepanu pöörata. Oli näha, et mitmed mujalt parasvöötimest pärit peremeestaimed võivad oma seenekoosluse poolest väga liigirikkad olla. Kuna mitmel juhul oli nende liigiline mitmekesisus kõrgem kui kohalikel taimedel, annab see märku taimeliigi või temaga kaasas oleva seeneliigi invasiivistumise ohust. Nagu on märkinud Wearn *et al.* (2012), tuleks ka iga individuaalset taime vaadata pilguga, mis käsitleb neid endofüütsete mikroorganismide eraldi ökosüsteemidena. Neis ökosüsteemides on olemas omavahel interakteeruvad erinevad eluvormid, kelle koosluse struktuuri mõjutavad taime kasvutingimused ning genotüüp. Kui õpime tundma neid väikeseskaalalisi ökosüsteeme, saame saadud teadmisi rakendada üha suuremate koosluste kokkupanekumustrite kirjeldamisel. Mida rohkem teadmisi meil liikide ja nende esinemise kohta on, seda täpsemalt oskame kirjeldada nendevahelisi interaktsioone, ökosüsteemide toimimist ja seal elavate liikide bioloogilist tähtsust.

Leian, et erinevate teadustööde juures on oluline teha oma kogutud andmed avalikult kättesaadavaks. Mõistlik on selleks kasutada andmehalduse platvorme, mis tagavad andmete vastavuse rahvusvahelistele standarditele ning ühes sellega andmete masinloetavuse. Kuigi ka uurimistööde lisades on kasutatud andmed tihti tabelina välja toodud, võimaldavad nimetatud avalikud andmehalduse platvormid neile automatiseeritud juurdepääsu. PlutoF sarnaste platvormide teine positiivne külg on võimalus publitseerida andmed rahvusvahelistes (näiteks GBIF¹³) või rahvuslikes (Eestis näiteks eElurikkus¹⁴) andmeportaalides. Kolmandaks plussiks on andmearhiividesse paigutatud andmete säilimine pikema aja jooksul kui isiklikus arvutis. Avalikes andmeportaalides publitseeritud andmeid saab kergesti otsida ja alla laadida ning kasutada hõlpsasti ka teistes uurimistöodes. Kokkuvõttes aitab andmete kättesaadavaks muutmine kaasa parematele üldistele teadmistele ja nende arusaadavale kommunikeerimisele.

Kokkuvõte

Laias tähenduses nimetatakse endofüütideks kõiki taimekudedes elavaid patogeene, mükoriisa ja juuremügarate moodustajaid, lagundajaid ning endofüüte nende kitsas mõistes. Endofüütsed seened kitsamas tähenduses on teatud eluperioodil taimekudedes elavad väliseid haigussümptomeid mittepõhjustavad mikroorganismid. Nii kitsas kui laias tähenduses endofüüte esineb globaalselt peaaegu kõigis soontaimeliikides ja paljudes sõnajalg- ning sammaltaimedes. Taimekudedes elavad kitsas mõistes endofüüdid pakuvad kaitset herbivooride ja patogeenide, põua ning kõrgete raskemetalli- või soolaioonide kontsentratsiooni vastu. Viimaste seente suhe taimega võimaldab neil mõlemal toime tulla varieeruvus keskkonnas ning asustada uusi sobivaid kasvukohti. Sellest tulenevalt võivad nii võõrad taime- kui ka seeneliigid uude kooslusse sattudes naturaliseeruda ning invasiivseks muutuda. Võõrliikide ohu vältimiseks tuleb lähemalt uurida teistest riikidest sisse toodud taimeliikidest kujundatud kollektioone. Botaanikaaedades on võõrliikide kasvatamisega tegeletud väga pikka aega ning kõik taimedega seonduv on täpselt dokumenteeritud. Seetõttu sobivad botaanikaaiad nii eksootiliste taime kui seeneliikide ja nende pikaajalise kooselu uurimiseks.

Minu magistritöö eesmärgiks oli võrrelda Tartu Ülikooli Botaanikaaias kasvavate puittaimede juurte ja lehtede endofüütsete seente mitmekesisust ning esinemissagedust erineva päritoluga peremeestaimedel. Püstitasin hüpoteesid, et kohalike puude seenestik on liigirikkam ning puittaimi koloniseerivad pigem kohalikud seeneliigid.

Tartu Ülikooli Botaanikaaias puittaimedes esines kokku 1124 liiki seeni. Neist sagedaseimad olid kottseened. Lehe-endofüütide mitmekesisus oli kõrgem kui juurtest isoleeritud seentel ning rohkem liike esines aias kasvavatel taimedel. Juure-endofüütide mitmekesisus oli aias ja kasvahoones sarnane. Endofüütide mitmekesisus ei sõltunud peremeestaime päritolust, kuid männiliste ja kaseliste endofüüdikooslusi mõjutas nende fülogeneetiline päritolu. Lehe-endofüütide mitmekesisusel esines proovi võtu koha ja mükoriisatüübi koosmõju. Arvatavasti näitab mükoriisatüübi olulisus leheproovide puhul erinevust okas- ja lehtpuude vahel, sest ektomükoriisa on valdav just okaspuude seas.

Kohalikke seeneliike oli vähem kui võõraid või senitundmatuid liike, kuid nende osakaal kogutud proovides oli suurem. Ligikaudu sada endofüüdi liiki ilmutasid kasvukohaelistust. Väritingimustes kasvavate taimede seenekooslus oli arvukam nii kohalike kui eksootiliste

seeneliikide arvelt. Kasvuhuones eelistasid valdavalt kasvada eksootilised endofüüdid, kusjuures ükski kohalik juure-endofüüt seal kasvada ei eelistanud.

Summary

In a broad sense, all microorganisms that inhabit plant tissues can be called endophytes. That includes pathogens, mycorrhizal and nodule-forming organisms, saprotrophs and endophytes *sensu stricto*. Endophytic fungi *sensu stricto* are nonharmful microorganisms that colonize plant tissues for at least a part of their life cycle. They have an ubiquitous distribution and are present in nearly all species of vascular plants and also in many ferns and mosses. Endophytes defend plants from herbivory and pathogens, and improve tolerance to drought, salt and heavy metals stress. The relationship between endophytes and their host plants enables them both to survive in the ever-changing environments and populate new suitable habitats. As a result, both alien plant and fungal species may naturalize and become invasive outside their local range. An investigation on how to prevent alien species in collections of imported plants from becoming a threat is required. Botanical gardens are institutions which have been dealing with exotic plants for extended periods of time and details of cultivars have been well documented. Consequently, botanical gardens fit the purpose of model ecosystems to study exotic plant and fungal species and their long-term interactions with each other.

The aim of this Master's Thesis was to compare the diversity and abundance of woody plant root and leaf endophytes in Tartu University Botanical Garden from host plants with distinct origin. We hypothesized that native trees have more diverse fungal community and that they are more likely to be colonized by local fungi as compared with introduced plants.

In total, we identified 1124 different fungal taxa from leaves and roots of woody plants with Ascomycota being the most prevalent taxonomic group. There were more distinct leaf endophytes than fungi isolated from roots and hosts growing outdoors harboured more species. For root inhabiting fungi, the distribution within the greenhouse and the garden was more even. Host plant native background did not influence the diversity of their fungal community, but the phylogenetic distance between groups seemed to effect Pinaceae and Betulaceae microfauna in a separate way. There was a combined interaction effect between the host sampling point and mycorrhizal type. Mycorrhizal influence on leaf communities probably mirrors the difference between deciduous trees and conifers, because the latter are largely dominated by ectomycorrhizal fungi.

Local fungal species richness was lower than for alien or undescribed species, although their occurrence in gathered samples was higher. Approximately a hundred endophytic species

showed some levels of habitat specificity. Plants growing outdoors hosted more numerous fungi from Estonia as well as from other locations. There were a few exotic pyloplane fungal taxa showing preference for greenhouse environment, whereas no local root endophyte favoured this closed tropical habitat.

Tänuavaldused

Täna Tartu Ülikooli Botaanikaia juhtkonda, kes andis mulle loa botaanikaia puittaimede seenestiku uurimiseks ning lehe- ja juureproovide korjamiseks. Suur aitäh minu juhendajale Tartu Ülikooli mükoloogia vanemteadurile Leho Tedersoole ning mulle andmebaasistamise ja publitseerimise osas nõu andnud Tartu Ülikooli loodusmuuseumi direktorile ja mükoloogia professorile Urmas Kõljälale. Lisaks täna kõiki mind laboris ja arvuti taga suunanud ja näpunäidetega varustanud mükoloogia töörühma liikmeid.

Kasutatud materjalid

Abarenkov K., Nilsson R.H., Larsson K-H., Alexander I.J., Eberhardt U., Erland S., Høiland K., Kjølner R., Larsson E., Pennanen T., Sen R., Taylor A.F.S., Tedersoo L., Ursing B.M., Vrålstad T., Liimatainen K., Peintner U., Kõljalg U. (2010a). The UNITE database for molecular identification of fungi- recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186: 281-285

Abarenkov K., Tedersoo L., Nilsson R.H., Vellak K., Saar I., Veldre V., Parmasto E., Proust M., Aan A., Ots M., Kurina O., Ostonen I., Jõgeva J., Halapuu S., Põldmaa K., Toots M., Truu J., Larsson K-H., Kõljalg U. (2010b). PlutoF- a Web Based Workbench for Ecological and Taxonomic Research, with an Online Implementation for Fungal ITS Sequences. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 6:189-196.

Anagnostakis S.L. (1987). Chestnut blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79: 23-37.

Alexander H.M. (1990). Epidemiology of Anther-Smut Infection of *Silene Alba* Caused by *Ustilago Violacea*: Patterns of Spore Deposition and Disease Incidence. *Journal of Ecology*, 78(1): 166.

Arnold E.A. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21:51-66.

Arnold A.E., Engelbrecht B.M.J. (2007). Fungal endophytes nearly double minimum leaf conductance in seedlings of a neotropical tree species. *Journal of Tropical Ecology*, 23(3): 369-372.

Arnold A.E., Herre E.A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (*Malvaceae*). *Mycologia*, 95: 388-398.

Arnold A.E., Maynard Z., Gilbert G.S., Coley P.D., Kursar T.A. (2002). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, 3(4): 267-274.

Ashton P.M.S., Berlyn G.P. (1992). Leaf adaptations of some *Shorea* species to sun and shade. *New Phytologist*, 121: 587-596.

- Bailey B.A., Strem M.D., Wood D. (2009). *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycological Research*, 112: 1365-1376.
- Ban Y., Tang M., Chen H., Xu Z., Zhang H., Yang Y. (2012). The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture. *PLOS ONE* 7(10): e47968.
- Behie S.W., Zelisko P.M., Bidochka M.J. (2012). Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants. *Science*, 336: 1576-1577.
- Bengtsson-Palme J., Ryberg M., Hartmann M., Branco S. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(10): 914-919.
- Bérubé J.A., Nicolas G.G. (2014). Alien fungal species on asymptomatic live woody plant material imported into Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(1): 67-81.
- Bischoff J.F., White J.F.Jr. (2005). Evolutionary development of the *Clavicipitaceae*. The fungal community: Its organisation and role in the ecosystem. Boca Raton, USA, Taylor & Francis: 505-518.
- Bjorbækmo M.F.M., Carlsen T., Brysting A., Vrålstad T., Høiland K., Ugland K.I., Geml J., Schumacher T., Kauserud H. (2010). High diversity of root associated fungi in both alpine and arctic *Dryas octopetala*. *BCM Plant Biology*, 10:244.
- Borcard D., Legendre P. (2002). All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecological Modelling*, 153: 51-68.
- Brocklehurst N. (2015). A simulation-based examination of residual diversity estimates as a method of correcting for sampling bias. *Paleontologica Electronica*, 18.3.7T: 1-15.
- Brunt C., Read J., Sanson G.D. (2006). Changes in Resource Concentration and Defence during Leaf Development in a Tough-Leaved (*Nothofagus moorei*) and Soft-Leaved (*Toona ciliata*) Species. *Oecologia*, 148(4): 583-592.
- Burgdorf R.J., Laing M.D., Morris C.D., Jamal-Allu S.F. (2014). A procedure to evaluate the efficiency of surface sterilization methods in culture-independent fungal endophyte studies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3): 977-983.

- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10:421.
- Camargo-Ricalde S.L. (2002). Dispersal, distribution and establishment of arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 71: 33-44.
- Cardona G., Mir A., Rosselló F., Rotger L., Sánchez D. (2013). Cophenetic metrics for phylogenetic trees, after Sokal and Rohlf. *BCM Bioinformatics*, 14:3.
- Carroll G. (1988). Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*, vol 69(1): 2-9.
- Carroll G., Petrini O. (1983). Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia*, 75(1):53-63.
- Chalot M., Brun A. (1998). Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(1): 21-44.
- Cheplick G.P. (2004). Recovery from drought stress in *Lolium perenne* (*Poaceae*): Are fungal endophytes detrimental? *American Journal of Botany*, 91(12): 1960-1968.
- Choo J., Sabri N.B.M., Tan D., Muhahid A., Müller M. (2015). Heavy metal resistant endophytic fungi isolated from *Nypa fruticans* in Kuching Wetland National Park. *Ocean Science Journal*, 50(2): 445-453.
- Chornesky E.A., Randall J.M. (2003). The Threat of Invasive Alien Species to Biological Diversity: Setting a Future Course. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 90(1): 67-76.
- Clay K. (2001). Symbiosis and the regulation of communities. *American Zoologist*, 41:810-824.
- Clay K., Cheplick G.P. (1989). Effect of ergot alkaloids from fungal endophyte-infected grasses on fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Journal of Chemical Ecology*, 15(1): 169-182.
- Clay K., Schardl C. (2002). Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. *The American Naturalist*, 160(S4): S99-S127.

- Coince A., Cordier T., Lengellé J., Defossez E., Vacher C., Robin C., Buée M., Marçais B. (2014). Leaf and Root-Associated Fungal Assemblages Do Not Follow Similar Elevational Diversity Patterns. *PLOS ONE*, 9(6): e100688.
- Coley P.D., Aide T.M. (1991). Comparison of herbivory and plant defenses in temperate and tropical broad-leaved forests. *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. John Wiley and Sons: 25-49.
- Colpaert J.V., Wevers J.H.L., Krznanic E., Adriaensen K. (2011). How metal-tolerant ecotypes of ectromycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Annals of Forest Science*, 68: 17-24.
- Davis E.C., Shaw A.J. (2008). Biogeographic and phylogenetic patterns in diversity of liverwort-associated endophytes. *American Journal of Botany*, 95(8): 914-924.
- Davison J., Moora M., Öpik M., Adholeya A., Ainsaar L., Bá A., Burla S., Diedhiou A.G., Hiiesalu I., Jairus T., Johnson N.C., Kane A., Koorem K., Kochar M., Ndiaye C., Pärtel M., Reier Ü., Saks Ü., Singh R., Vasar M., Zobel M. (2015). FUNGAL SYMBIONTS. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349(6251): 970-973.
- Dawson W., Mndolwa A.S., Burslem D.F.R.P., Hulme P.E. (2008). Assessing the risks of plant invasions arising from collections in tropical botanic gardens. *Biodiversity and Conservation*, 17(8): 1979-1995.
- De Bary A. (1886). *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Leipzig.
- Deckert R.J., Peterson R.L. (2000). Distribution of foliar fungal endophytes of *Pinus strobus* between and within host trees. *Canadian Journal of Botany*, 30:1436-1442.
- Dighton J. (2007). Nutrient cyclic by saprotrophic fungi in terrestrial habitats. *The Mycota IV Environmental and Microbial Relationships* (2nd Edn.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 287-300.
- Edgar R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26:2460-2461.

- Eek L., Kukk T, Marvet A (Toim.). (2013). Maismaa võõrliikide käsiraamat. Keskkonnaministeerium ja autorid, 2. trükk.
- Fracchia S., Krapovickas L., Aranda-Rickert A., Valentinuzzi V.S. (2011). Dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes by *Ctenomys cf. knighti* (Rodentia) in the northern Monte Desert of Argentina. *Journal of Arid Environments*, 75(11): 1016-1023.
- Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S., Li W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28: 3150-3152.
- Fuchs B., Krauss J. (2018). Can Epichloë endophytes enhance direct and indirect plant defence? *Fungal Ecology*, 38(2019): 98-103.
- Galera H., Sudnik-Wójcikowska B. (2010). Central European Botanic Gardens as Centres of Dispersal of Alien Plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 79 (2):147-156.
- Gamboa M.A., Laureano S., Bayman P. (2002). Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia*, 156:41-45.
- Ganley R.J., Brunsfeld S.J., Newcombe G. (2004). A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27): 10107-10112.
- Giaque H., Hawkes C.V. (2016). Historical and current climate drive spatial and temporal patterns in fungal endophyte diversity. *Fungal Ecology*, 20:108-114.
- Giraldo M.C., Valent B. (2012). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 800-814.
- Girlanda M., Ghignone S., Luppi A.M. (2002). Diversity of sterile root-associated fungi of two Mediterranean plants. *New Phytologist*, 155:481-498.
- Glynou K., Ali T., Buch A-K., Kia S.H., Ploch S., Xia X., Çelik A., Thines M., Maciá-Vicente J.G. (2015). The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environmental Microbiology*, 18(8): 2418-2434.
- Guo L.D., Hyde K.D., Liew E.C.Y. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *The New Phytologist*, 147(3): 617-630.

- Grierson C., Schiefelbein J. (2002). Root Hairs. *The Arabidopsis Book*, 1: e0060.
- Göransson P., Olsson P.A., Postma J., Falkengren-Grerup U. (2008). Colonisation by arbuscular mycorrhizal and fine endophytic fungi in four woodland grasses- variation in relation to pH and aluminium. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9): 2260-2265.
- Harvais G., Hadley G. (1966). The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*, 66:205-215.
- Hawksworth D.L., Lücking R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2,2 to 3,8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5(4): 79-95.
- Herre E.A., Mejia L.C., Kyllö D.A., Rojas E., Maynard Z., Butler A., Van Bael S.A. (2007). Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 88(3): 550-558.
- Hibbett D.S., Ohman A., Glotzer D., Nuhn M., Kirk P., Nilsson R.H. (2011). Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, 25(1): 38-47.
- Higgins K.L., Arnold A.E., Miadlikowska J., Sarvate S.D., Lutzoni F. (2007). Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(2): 543-555.
- Hill A.W. (1915). The history and functions of botanic gardens. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2(1-2): 185-240.
- Hipol R., Magtoto L., Damatac A., Tamang S.M. (2014). Antioxidant Activities of Fungal Endophytes Isolated from Strawberry *Fragaria x ananassa* Fruit. *Electronic Journal of Biology*, 10(4): 107-112.
- Hoffman M.T., Arnold A.E. (2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research*, 112(3): 331-344.
- Hubbard M., Germida J., Vujanovic V. (2012). Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress. *Botany*, 90:137-149.

- Hubbard M., Germida J.J., Vujanovic V. (2013). Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1): 109-122.
- Hughes K.A., Lawley B., Newsham K.K. (2003). Solar UV-B Radiation Inhibits the Growth of Antarctic Terrestrial Fungi. *American Society for Microbiology*, 69(3): 1488-1491.
- Hulme P.E. (2011). Addressing the threat to biodiversity from botanic gardens. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(4): 168-174.
- Hyams E., MacQuitty W. (1969). *Great botanical gardens of the World*. Bloomsbury Books, London: 16.
- Ilves K. (2017). Trühvliste elurikkus ja levikumustrid Eestis. Bakalaureusetöö. Tartu, Tartu Ülikool.
- Jumpponen A., Jones K.L. (2010). Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytologist*, 186: 496-513.
- Kalamees K. (Toim.), Hanso M., Järva L., Jürisson I., Kalamees K., Karis H., Kask K., Kastanje V., Kullman B., Leenurm K., Liiv V., Lõiveke H., Noor H., Normet T., Parmasto E., Põldmaa K., Raitviir A., Ramst U., Ruubas I., Sarv J., Soobik P., Suija A., Sõmermaa A-L., Vaasma M., Vahter H., Veldre S., Öpik M. (2000). *Eesti Seenestik*. Tartu: EPMÜ Zooloogia ja Botaanika Instituut.
- Kannadan S., Rudgers J.A. (2008). Endophyte symbiosis benefits a rare grass under low water availability. *Functional Ecology*, 22(4): 706-713.
- Khan I.A., Abourashed E.A. (2011). *Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients: Used in Food, Drugs and Cosmetics*, 3rd Edition. Wiley & Sons.
- Ko Ko T.W., Stephenson S.L., Bahkali A.H., Hyde K.D. (2011). From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes?. *Fungal Diversity*, 50:113-120.
- Kraus G. (1894). *Geschichte der Pflanzenfamilien in die europäischen botanischen Gärten*. Leipzig.

- 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(3): 648-657.
- Krivtsov V., Watling R., Walker S.J.J., Knott D., Palfreyman J.W., Staines H.J. (2003). Analysis of fungal fruiting patterns at the Dawyck Botanic Garden. *Ecological Modelling*, 170(2003): 393-406.
- Kukk T. (1999). Eesti taimestik. Tartu, Teaduste Akadeemia kirjastus.
- Kull T., Kukk T. (Toim.) (2005). Invasiivsed võõrliigid Eestis. Keskkonnaministeerium,
- Kusari S., Hertweck C., Spiteller M. (2012). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7): 792-798.
- Kõljalg U., Nilsson R.H., Abarenkov K., Tedersoo L., Taylor A.F., Bahram M., Bates S.T., Bruns T.D., Bengtsson-Palme J., Callaghan T.M., Douglas B., Drenkhan T., Eberhardt U, Dueñas M., Grebenc T., Griffith G.W., Hartmann M., Kirk P.M., Kohout P., Larsson E., Lindahl B.D., Lücking R., Martin M.P., Matheny P.B., Nguyen N.H., Niskanen T., Oja J., Peay K.G., Peintner U., Peterson M., Põldmaa K., Saag L., Saar I., Schübler A., Scott J.A., Senés C., Smith M.E., Suija A., Taylor D.L., Telleria M.T., Weiss M., Larsson K.H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22(21): 5271-5277.
- Kõljalg U., Tedersoo L., Nilsson R.H., Abarenkov K. (2016). Digital identifiers for fungal species. *Science*, 352(6290): 1182-1183.
- Lacap D.C., Hyde K.D., Liew E.C.Y. (2003). An evaluation of the fungal „morphotype“ concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 12: 53-66.
- Last F.T. (1955). Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. *Transactions of the British Mycological Society*, 38:221-239.
- Legendre P., Gallagher E.D. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129: 271-280.
- Lehnert M., Krug M., Kessler M. (2017). A review of symbiotic fungal endophytes in lycophytes and ferns- a global phylogenetic and ecological perspective. *Symbiosis*, 71: 77-89.

- Li X., He X., Hou L., Ren Y., Wang S., Su F. (2018). Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition. *Scientific Reports*, 8: 7896.
- Luo Z-P., Lin H-Y., Ding W-B., He H-L., Li Y-Z. (2015). Phylogenetic Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with *Tephrosia purpurea*. *Mycobiology*, 43(4): 435-443.
- Maciá-Vicente J.G., Ferraro V., Burruano S., Lopez-Llorca L.V. (2012). Fungal Assemblages Associated with Roots of Halophytic and Non-halophytic Plant Species Vary Differentially Along a Salinity Gradient. *Microbial Ecology*, 64: 668-679.
- Magnuson J.K., Lasure L.L. (2002). Fungal Diversity in Soils as Assessed by Direct Culture and Molecular Techniques. Salt Lake: Abstracts from the 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology: 19-23.
- Maharachchikumbura S.S.N., Hyde K.D., Jones E.B.G., McKenzie E.H.C., Bhat J.D., Dayarathne M.C., Huang S-K., Norphanphoun C., Senanayake I.C., Perera R.H., Shang Q-J., Xiao Y., Dsouza M.J., Hongsanan S., Jayawardena R.S., Daranagama D.A., Konta S., Goonasekara I.D., Zhuang W.Y., Jeewon R., Phillips A.J.L., Abdel-Wahab M.A., Al-Sadi A.M., Bahkali A.H., Boonmee S., Boonyuen N., Cheewangkoon R., Dissanayake A.J., Kang J., Li Q-R., Liu J.K., Liu X.Z., Liu Z-Y., Luangsa-ard J.J., Pang K-L., Phookamsak R., Promputtha I., Suetrong S., Stadler M., Wen T., Wijayawardene N.N. (2016). Families of *Sordariomycetes*. *Fungal Diversity*, 79: 1–317.
- Malapi-Wight M., Salgado-Salazar C., Demers J., Veltri D., Crouch J.A. (2015). Draft Genome Sequence of *Dactylonectria macrodidyma*, a Plant-Pathogenic Fungus in the *Nectriaceae*. *Genome Announcements*, 3(2): e00278-15.
- Marler M.J., Zabinski C.A., Callaway R.M. (1999). Mycorrhizae indirectly enhance competitive effects of an invasive forb on a native bunchgrass. *Ecological Society of America*, 80(4): 1180-1186.
- Martino E., Turnau K., Girlanda M., Bonfante M., Perotto S. (2000). Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and growth in the presence of zinc ions. *Mycological Research*, 104(3): 338-344.

- Materatski P., Varanda C., Carvalho T., Dias A.B., Campos M.D., Rei F., Félix M.R. (2019). Spatial and temporal variation of fungal endophytic richness and diversity associated to the phyllosphere of olive cultivars. *Fungal Biology*, 123(1): 66-76.
- McIlveen W.D., Cole H Jr. (1976). Spore dispersal of *Endogonaceae* by worms, ants, wasps, and birds. *Canadian Journal of Botany*, 54(13): 1486-1489.
- Miller J.D. (1986). Toxic metabolites of epiphytic and endophytic fungi of conifer needles. *Microbiology of the phyllosphere*, Cambridge University Press: 223-231.
- Mitchell C.E., Power A.G. (2003). Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature* 241: 625-627.
- Nilsson H.R., Wurzbacher C., Bahram M., Coimbra V.R.M., Larsson E., Tedersoo L., Eriksson J., Duarte C., Svantesson S., Sánchez-García M., Ryberg M.K., Kristiansson E., Abarenkov K. (2016). Top 50 most wanted fungi. *Mycology*, 12:29-40.
- Nilsson R.H, Anslan S, Bahram M, Wurzbacher C, Baldrian P, Tedersoo L. (2019). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17 (2): 95-109.
- Nisa H., Kamili A.N., Nawchoo I.A., Shafi S., Shameem N., Bandh S.A. (2015). Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis*, 82:50-59.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Sólymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H. (2014). *Package vegan: Community Ecology Package*.
- Pandey A. (2019). Are dark septate endophytes bioindicators of climate in mountain ecosystems? *Rhizosphere*, 9: 110-111.
- Pardatscher R., Schweigkofler W. (2009). Microbial biodiversity associated with the walnut *Juglans regia* L. in South Tyrol (Italy). *Mitteilungen Klosterneuburg* 59: 24-30.
- Pattnaik S., Subramanyam V.R., Kole C. (1996). Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*, 86(349): 237-246.

- Peterson R.L., Wagg C., Pautler M. (2008). Associations between microfungial endophytes and roots: do structural features indicate function?. *Botany*, 86:445-456.
- Petrini O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: Andrews J.H., Hirano S.S. (eds) *Microbial Ecology of Leaves*. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York.
- Phillips M.A., Croteau R.B. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*, 4(5): 184-190.
- Postma J.W.M., Olsson P.A., Falkengren-Grerup. (2007). Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, finne endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2): 400-408.
- Promptuttha I., Lumyong S., Dhanasekaran V., Mckenzie E., Hyde K.D., Jeewon R. (2007). A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotrophs at Host Senescence. *Microbial Ecology*, 53(4): 579-590.
- Rapoport E.H. (1982), *Areography: Geographical Strategies of Species* (Fundación Bariloche series). Pergamon Pr.
- Redman R.S., Sheehan K.B., Stout R.G., Rodriguez R.J., Henson J.M. (2002). Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. *Science*, 298: 1581.
- Remm K., Remm J., Kaasik A. (2012). Ruumiliste loodusandmete statistiline analüüs. *Õpik-käsiraamat*. Tartu Ülikooli Ökoloogia ja Maateaduste Instituut: 240. <http://hdl.handle.net/10062/26456>
- Reuter J.A., Spacek D.V., Snyder M.P. (2015). High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell*, 58(4): 586-597.
- Rhoads A, Au K.F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 13(5):278-289.
- Rodriguez R.J., Henson J., Volkenburgh E.V., Hoy M., Wright L. Beckwith F., Kim Y-O., Redman R.S. (2008). Stress tolerance in plants via habitat adapted symbiosis. *The ISME Journal*, 2: 404-416.

- Rodriguez R.J., White J.F.Jr, Arnold A.E., Redman R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2): 314-330.
- Rossi M.J., Furigo A. Jr., Oliveira V.L. (2007). Inoculant Production of Ectomycorrhizal Fungi by Solid and Submerged Fermentations. *Food Technology and Biotechnology*, 45(3): 277-286.
- Saikkonen K. (2007). Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*, 21 (2-3): 67-74.
- 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 29:319-343.
- Saikkonen K., Wäli P., Helander M., Faeth S.H. (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9(6): 275-280.
- Sander H., (2007). Eesti arboreetumid loodusgeograafi pilgu läbi. Tammet T. (Toim.) Eesti parkide almanahh. Muinsuskaitseamet, Keskkonnaministeerium, Kroonpress, Tallinn: 174-192.
- Scervino J.M., Gottlieb A., Silvani V.A., Pergola M., Fernandez L., Godeas A.M. (2009). Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1752-1756.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7537-7541.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16): 6241-6246.
- Schulz B. (2006). Mutualistic Interactions with Fungal Root Endophytes. *Soil Biology*, vol 9:261-279.

- Schulz B. J., Wanke U., Draeger S., Aust H-J. (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: Effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97(12): 1447-1450.
- Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A-K., Krohn K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106: 996-1004.
- Sellmann D., Bogner F.X. (2013). Climate change education: quantitatively assessing the impact of a botanical garden as an informal learning environment. *Environmental Education Research*, 19(4): 415-429.
- Selosse M-A., Schneider-Maunoury L., Marthos F. (2018). Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged.
- Sherameti I., Tripathi S., Varma A., Oelmüller R. (2008). The Root-Colonizing Endophyte *Piriformospora indica* Confers Drought Tolerance in *Arabidopsis* by Stimulating the Expression of Drought Stress-Related Genes in Leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol 21(6):779-807.
- Shipunov A., Newcombe G., Raghavendra A.K.H., Anderson C.L. (2008). Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. *American Journal of Botany* 95(9): 1096-1108.
- Siddiqui Y., Ali A. (2014). Chapter 11- *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). *Postharvest Decay: Control Strategies*. Academic Press: 337-371.
- Singaravelan N., Grishkan I., Beherav A., Wakamatsu K., Ito S., Nevo E. (2009). Adaptive Melanin Response of the Soil Fungus *Aspergillus Niger* to UV Radiation Stress at „Evolution Canyon“, Mount Carmel, Israel. *PLOS ONE*, 3(8): e2993.
- Soudzilovskaia N.A., Vaessen S., Zelfde M., Raes N. (2017). Global Patterns of Mycorrhizal Distribution and Their Environmental Drivers. *Population ecology in ectomycorrhizal fungi*, Springer International Publishing: 223-235.
- Spencer R., Cross R. (2017). The origins of botanic gardens and their relation to plant science, with special reference to horticultural botany and cultivated plant taxonomy. *Muelleria*, 35:43-93.
- Stamets P., Chilton J.S. (1983). *The Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home*. Agarikon Press, Olympia, Washington: 19.

- Stearn W.T. (1965). The origin and later development of cultivated plants. *Journal of the Royal Horticultural Society*, 90:279-341.
- Stearn W.T. (1971). Sources of information about botanic gardens and herbaria. *Biological Journal of the Linnean Society*, 3:225-233.
- Stefani F.O.P, Bérubé J.A. (2006). Biodiversity of foliar fungal endophytes in white spruce (*Picea glauca*) from southern Québec. *Canadian Journal of Botany*, 84:777-790.
- Stierle A.A., Stierle D.B. (2015). Bioactive Secondary Metabolites Produced by the Fungal Endophytes of Conifers. *Natural product communications*, 10(10): 1671-1682.
- Zanne A.E, Tank D.C., Cornwell K., Eastman J.M., Smith S.A., FitzJohn R.G., McGlenn D.J., O'Meara B.C., Moles A.T., Reich P.B., Royer D.L., Soltis D.E., Stevens P.F., Westoby M., Wright I.J., Aarssen L., Bertin R.I., Calaminus A., Govaerts R., Hemmings F., Leishman M.R., Oleksyn J., Soltis P.S., Swenson N.G., Warman L, Beaulieu J.M. (2014). Three keys to the radiation of angiosperms into freezing environments. *Nature*, 506: 89-92.
- Zhang N, Castlebury L.A, Miller A.N, Huhndorf S.M, Schoch C.L, Seifert K.A, Rossman A.Y, Rodgers J.D, Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B, Sung G-H. (2006). An overview of the systematics of the *Sordariomycetes* based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98(6):1076-1087.
- Zhang Y., Zhang Y., Liu M., Shi X., Zhao Z. (2008). Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: Their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals *In Vitro*. *The Journal of Microbiology*, 46(6): 624-632.
- Zimmerman N.B., Vitousek P.M. (2011). Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(32):13022-13027.
- Taylor D.L., Jollingsworth T.N., McFarland J.W., Lennon N.J., Nusbaum C., Ruess R.W. (2014). A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecological Monographs*, 84(1): 3-20.
- Taylor T.N., Klavins S.D., Krings M., Taylor E.L., Kerp H., Hass H. (2004). Fungi from the Rhynie chert: a view from the dark side. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh, Earth Sciences*, 94: 457-473.

- Taylor T.N., Krings M. (2005). Fossil microorganisms and land plants: Associations and interactions. *Symbiosis*, 40: 119-135.
- Taylor T.N., Krings M., Kerp H. (2006). *Hassliella monospora* nov. gen. Et sp., a microfungus from the 400 million year old Rhynie chert. *Mycological Research*, 110: 628-632.
- Tedersoo L., Bahram M., Põlme S., Kõljalg U., Yorou N.S., Wijesundera R., Ruiz L.V. *et al.* (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 236(6213), 1256688.
- Tedersoo L., Bahram M., Toots M., Diédhiou A.G., Henkel T.W., Kjøller R., Morris M.H., Nara K., Nouhra E., Peay K.G., Põlme S., Ryberg M., Smith M.E., Kõljalg U. (2012). Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, 21: 4160-4170.
- Tedersoo L., Lindahl B. (2016). Fungal identification biases in microbiome projects. *Environmental Microbiology Reports*, 8: 774-779.
- Tedersoo L., Pärtel K., Jairus T., Gates S., Põldmaa K., Tamm H. (2009). Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the *Helotiales*. *Environmental Microbiology*, 11:3166-3178.
- Tedersoo L., Tooming-Klunderud A., Anslan S. (2017). PacBio metabarcoding of *Fungi* and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytologist*, 2017: 1370-1385.
- Terhonen E., Blumenstein K., Kovalchuk A., Asiegbu F.O. (2018). Forest Tree Microbiomes and Associated Fungal Endophytes: Functional Roles and Impact on Forest Health. *Forests*, 10(1): 42.
- Tibbets T.M., Faeth S.H. (1999). Neotyphodium endophytes in grasses: deterrents or promoters of herbivory by leaf-cutting ants?. *Oecologia*, vol 118(3):297-305.
- Toju H., Yamamoto S., Sato H., Tanabe A.S., Gilbert G.S., Kadowaki K. (2013). Community composition of root-associated fungi in a *Quercus*-dominated temperate forest: „codominance“ of mycorrhizal and root-endophytic fungi. *Ecology and Evolution*, 3(5):1281- 1293.
- U'Ren J.M., Lutzoni F., Miadlikowska J., Laetsch A.D., Arnold A.E. (2012). Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American Journal of Botany*, 99(5): 898-914.

UNITE Community (2019): Full UNITE+INSD dataset for Fungi. Version 18.11.2018.

<https://doi.org/10.15156/BIO/786347>

Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Backer K., Fischer M., Heier T., Hückelhoven R., Neumann C., Wettstein D., Franken P., Kogel K-H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(20): 9683-9685.

Van Bael S., Catalina Estrada, Arnold A.E. (2017). Chapter 6 Foliar Endophyte Communities and Leaf Traits in Tropical Trees. *The Fungal Community*, Taylor & Francis Group: 79-94.

Valkama E., Koricheva J., Salminen J-P., Helander M., Saloniemi I., Saikkonen K., Pihlaja K. (2005). Leaf surface traits: Overlooked determinants of birch resistance to herbivores and foliar micro-fungi? *Trees*, 19: 191-197.

Van der Wal A., Geydan T.D., Kuyper T.W., de Boer W. (2012). A thready affair: lingering fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 37: 477-194.

Walther G-R., Roques A., Hulme P.E., Sykes M.T., Pyšek P., Kühn I., Zobel M., Bacher S., Botta-Dukát Z., Bugmann H., Czúcz B., Dauber J., Hickler T., Jarošík V., Kenis M., Klotz S., Minchin D., Moora M., Nentwig V., Ott J., Panov V.E., Reineking B., Robinet C., Semchenko V., Solarz W., Thuiller W., Vilà M., Vohland K., Settele J. (2009). Alien species in a warmer world: risks and opportunities. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(12):686-693.

Wearn J.A., Sutton B.C., Morley N.J., Gange A.C. (2012). Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *Journal of Ecology*, 100: 1085-1092.

Weiß C.H. (2007). StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: STATISTICA, version 8. *Advances in Statistical Analysis* 91(3): 339-341.

Williamson M. (1996). *Biological invasions*. Chapman and Hall, London-Wienheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras.

Wilson D. (1995a). Endophyte: The Evolution of a Term and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, vol 73(2):274-276.

- Wilson D. (1995b). Fungal endophytes which invade insect galls: insect pathogens, benign saprophytes, or fungal inquilines? *Oecologia*, 103(2): 255-260.
- Wilson D., Barr M.E., Faeth S.H. (1997). Ecology and description of a new species of *Ophiognomonia* endophytic in the leaves of *Quercus emoryi*. *Mycologia*, 89(4): 537-546.
- Wyse J.P.S. (1999). Experimentation on a Large Scale- An Analysis of the Holdings and Resources of Botanic Gardens. *BGCNews*, 3(3). Botanic Gardens Conservation International, UK.
- Yamaji K., Watanabe Y., Masuya H., Shigeto A., Yui H., Haruma T. (2016). Root Fungal Endophytes Enhance Heavy-Metal Stress Tolerance of *Clethra barbinervis* Grown Naturally at Mining Sites via Growth Enhancement, Promotion of Nutrient Uptake and Decrease of Heavy-Metal Concentration. *PLOS ONE*, 11(12): e0169089.
- Yamamoto S., Hirotohi S., Tanabe A.S., Hidaka A., Kadowaki K., Toju H. (2014). Spatial Segregation and Aggregation of Ectomycorrhizal and Root-Endophytic Fungi in the Seedlings of Two *Quercus* Species. *PLOS ONE*, 9(5): 196363.
- You Y-H., Park J.M., Seo Y.G., Lee W., Kang M-S., Kim J-G. (2017). Distribution, Characterization, and Diversity of the Endophytic Fungal Communities on Korean Seacoasts Showing Contrasting Geographic Conditions. *Mycobiology*, 45(3): 150-159.

Kasutatud veebiaadressid

1. <https://www.bgci.org/resources/1528/> viimati vaadatud 18.05.2019
2. <https://www.hortusleiden.nl/en/the-hortus/history> viimati vaadatud 18.05.2019
3. http://ec.europa.eu/environment/nature/invasivealien/index_en.htm viimati vaadatud 18.05.2019
4. <https://www.envir.ee/et/voorliigid> viimati vaadatud 18.05.2019
5. <https://www.botaanikaaed.ut.ee/et> viimati vaadatud 19.05.2019
6. http://gis.ut.ee/veebikaart_est/ viimati vaadatud 19.05.2019
7. <https://github.com/torognes/vsearch>, Rognes T., Mahe F., Flouri T. (2014-2015). Viimati vaadatud 19.05.2019
8. <http://phylodiversity.net/phyloomatic/> viimati vaadatud 19.05.2019
9. <https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.0/topics/cophenetic> viimati vaadatud 19.05.2019
10. <https://www.rdocumentation.org/packages/vegan/versions/2.4-2/topics/pcnm> viimati vaadatud 19.05.2019
11. <https://www.primer-e.com/our-software/permanova-add-on/> viimati vaadatud 19.05.2019
12. <https://www.gbif.org/dataset/c4a654a1-24ef-4e39-83f8-77817a593c27> viimati vaadatud 19.05.2019
13. <https://www.gbif.org/what-is-gbif>, GBIF: The Global Biodiversity Information Facility. (2018). *What is GBIF?* viimati vaadatud 23.05.2019
14. <https://elurikkus.ee> viimati vaadatud 23.05.2019

Lisad

Lisa 1. Fisheri testi tulemused lehe- ja juureproovidest.

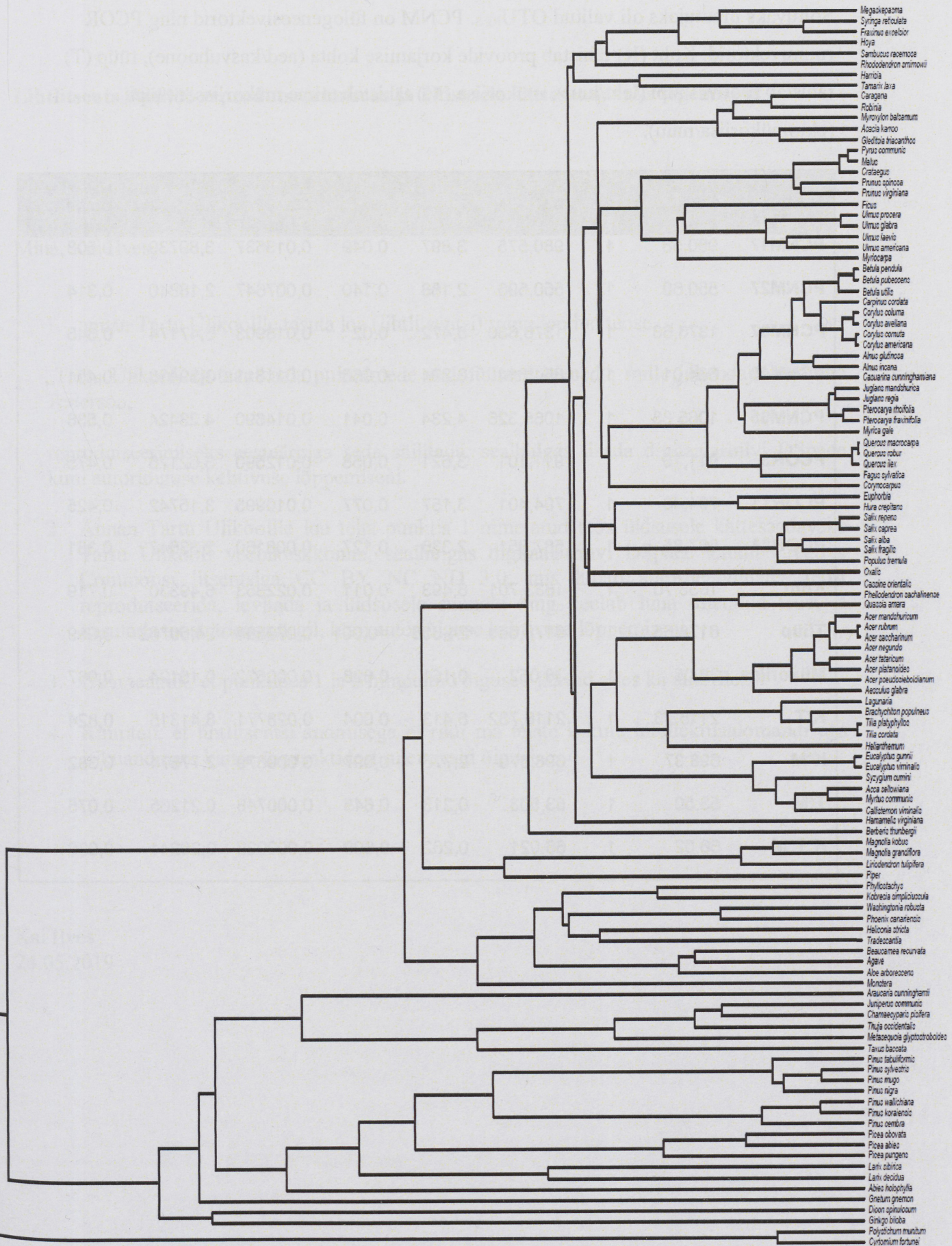
Toodud on 119 kõige sagedasema endofüüdi kasvukohaelistus.

Proovi tüüp	OTU	Takson	P-väärtus	Päritolu	Kasvukoht
Leht	Otu0001	<i>Coprinellus</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0002	<i>Colletotrichum_gloeosporioides</i>	p= 0,011	Est	Aed
Leht	Otu0024	<i>Cercospora</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0075	<i>Plectosphaerella</i>	p= 0,0028	Est	Aed
Leht	Otu0204	<i>Ilyonectria</i>	p= 0,173	Est	Aed
Leht	Otu0241	<i>Malassezia</i>	p= 0,192	Est	Aed
Leht	Otu0276	<i>Coprinellus_disseminatus</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0313	<i>Lycoperdon_perlatum</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0315	<i>Malassezia</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0317	<i>Coprinopsis_atramentaria</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0346	<i>Melampsorium_hiratsukanum</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0479	<i>Pseudomicrostroma_phylloplanum</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu0494	<i>Coprinus</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0523	<i>Trichomeriaceae</i>	p= 0,011	Muu	Aed
Leht	Otu0566	<i>Kretzschmaria_deusta</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu0572	<i>Ganoderma_applanatum</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0586	<i>Kondoa_aeria</i>	p= 0,002	Muu	Aed
Leht	Otu0633	<i>Knufia</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu0647	<i>Sordariomycetes</i>	p< 0,001	Muu	Kasvuhoone
Leht	Otu0648	<i>Bjerkandera_adusta</i>	p< 0,001	Est	Kasvuhoone
Leht	Otu0654	<i>Kondoa</i>	p= 0,002	Muu	Aed
Leht	Otu0686	<i>Hypoxylon_rubiginosum</i>	p= 0,619	Est	Aed
Leht	Otu0688	<i>Taphrina</i>	p= 0,002	Est	Aed
Leht	Otu0691	<i>Knufia_cryptophialidica</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0695	<i>Filobasidium_wieringae</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0711	<i>Exophiala</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0712	<i>Aureobasidium_pullulans</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0719	<i>Erythrobasidium_hasegawianum</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0762	<i>Alternaria</i>	p= 0,104	Est	Aed
Leht	Otu0791	<i>Acremonium</i>	p< 0,001	Muu	Kasvuhoone
Leht	Otu0799	<i>Symmetrospora_coprosmae</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0813	<i>Acremonium</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu0814	<i>Acremonium</i>	p= 0,006	Muu	Kasvuhoone
Leht	Otu0819	<i>Tumularia</i>	p< 0,001	Muu	Kasvuhoone
Leht	Otu0824	<i>Xylaria_polymorpha</i>	p= 0,488	Est	Aed

Leht	Otu0830	<i>Neosetophoma</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0832	<i>Neosetophoma</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu0835	<i>Fungi</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu0838	<i>Leptosphaeriaceae</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0870	<i>Buckleyzyma_aurantiaca</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0933	<i>Erythrobasidiales</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu0944	<i>Acronium_charticola</i>	p< 0,001	Muu	Kasvuhoone
Leht	Otu0952	<i>Leptosphaeria_rubefaciens</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu0968	<i>Penicillium_olsonii</i>	p< 0,001	Est	Kasvuhoone
Leht	Otu0992	<i>Occultifur</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1026	<i>Foliophoma_fallens</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1053	<i>Fungi</i>	p< 0,001	Muu	Kasvuhoone
Leht	Otu1086	<i>Septoria</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1122	<i>Rhexocercosporidium</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1179	<i>Fungi</i>	p= 0,004	Est	Kasvuhoone
Leht	Otu1193	<i>Fungi</i>	p= 0,541	Est	Aed
Leht	Otu1212	<i>Pseudeurotiaceae</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1214	<i>Cladosporium</i>	p< 0,001	Muu	Kasvuhoone
Leht	Otu1220	<i>Xylariales</i>	p= 0,002	Est	Aed
Leht	Otu1239	<i>Pseudomassaria_chondrospora</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1240	<i>Aspergillus_pseudoglaucus</i>	p= 0,335	Est	Kasvuhoone
Leht	Otu1242	<i>Cladosporium_cladosporioides</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1253	<i>Cladosporium_perangustum</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1283	<i>Vishniacozyma_victoriae</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1312	<i>Cryptococcus</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1320	<i>Dactylonectria_macrodidyma</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1364	<i>Neocatenulostroma_germanicum</i>	p= 0,01	Est	Aed
Leht	Otu1377	<i>Angustimassarina</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1378	<i>Capnodiales</i>	p= 0,002	Muu	Aed
Leht	Otu1381	<i>Epicoccum_nigrum</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1385	<i>Zymoseptoria</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1391	<i>Ascochyta</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1399	<i>Sporormiella</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1401	<i>Boeremia_exigua</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1402	<i>Neosascochyta</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1405	<i>Neofusicoccum_ribis</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1414	<i>Mycosphaerella_punctiformis</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1419	<i>Botrytis_cinerea</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1427	<i>Ramularia</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1429	<i>Didymellaceae</i>	p= 0,003	Est	Aed
Leht	Otu1433	<i>Sporormiella</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1437	<i>Ramularia_vizellae</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1439	<i>Ramularia</i>	p< 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1441	<i>Sporormiella</i>	p= 0,002	Muu	Aed
Leht	Otu1458	<i>Dioszegia_athyri</i>	p< 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1465	<i>Ramularia_citricola</i>	p< 0,001	Muu	Aed

Leht	Otu1486	<i>Teratosphaeriaceae</i>	p < 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1494	<i>Vishniacozyma_heimaeensis</i>	p = 0,01	Muu	Aed
Leht	Otu1504	<i>Vishniacozyma_carnescens</i>	p < 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1508	<i>Vishniacozyma_tephrensis</i>	p < 0,001	Muu	Aed
Leht	Otu1510	<i>Vishniacozyma</i>	p < 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1513	<i>Dioszegia_takashimae</i>	p < 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1518	<i>Cryptococcus</i>	p < 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1519	<i>Cryptococcus</i>	p < 0,001	Est	Aed
Leht	Otu1525	<i>Vishniacozyma_dimenna</i>	p = 0,01	Est	Aed
Leht	Otu1544	<i>Bullera_crocea</i>	p = 0,002	Est	Aed
Juur	Otu0033	<i>Harzia_velata</i>	p < 0,001	Est	Aed
Juur	Otu0075	<i>Plectosphaerella</i>	p = 0,234	Est	Kasvuhoone
Juur	Otu0204	<i>Ilyonectria</i>	p < 0,001	Est	Aed
Juur	Otu0572	<i>Ganoderma_applanatum</i>	p = 0,218	Est	Aed
Juur	Otu0603	<i>Cadophora</i>	p < 0,001	Est	Aed
Juur	Otu0624	<i>Exophiala</i>	p = 0,001	Est	Aed
Juur	Otu0626	<i>Exophiala_equina</i>	p < 0,001	Est	Aed
Juur	Otu0634	<i>Cadophora</i>	p = 0,001	Est	Aed
Juur	Otu0929	<i>Cadophora</i>	p = 0,002	Est	Aed
Juur	Otu1046	<i>Fungi</i>	p < 0,001	Muu	Kasvuhoone
Juur	Otu1047	<i>Fusarium_solani</i>	p = 0,442	Muu	Kasvuhoone
Juur	Otu1058	<i>Fusarium</i>	p = 0,109	Muu	Kasvuhoone
Juur	Otu1079	<i>Fusarium</i>	p < 0,001	Muu	Kasvuhoone
Juur	Otu1088	<i>Phialocephala_europaea</i>	p < 0,001	Est	Aed
Juur	Otu1144	<i>Acremonium_furcatum</i>	p = 0,020	Muu	Kasvuhoone
Juur	Otu1155	<i>Monographella</i>	p = 0,061	Muu	Aed
Juur	Otu1179	<i>Fungi</i>	p = 0,541	Est	Aed
Juur	Otu1183	<i>Fungi</i>	p < 0,001	Muu	Kasvuhoone
Juur	Otu1193	<i>Fungi</i>	p = 0,081	Est	Aed
Juur	Otu1224	<i>Ascomycota</i>	p < 0,001	Est	Aed
Juur	Otu1320	<i>Dactylonectria_macrodidyma</i>	p < 0,001	Muu	Aed
Juur	Otu1334	<i>Neonectria</i>	p < 0,001	Muu	Kasvuhoone
Juur	Otu1336	<i>Nectriaceae</i>	p < 0,001	Muu	Kasvuhoone
Juur	Otu1349	<i>Fusarium</i>	p = 0,750	Est	Kasvuhoone
Juur	Otu1355	<i>Neonectria_candida</i>	p < 0,001	Est	Aed
Juur	Otu1370	<i>Neonectria_lugdunensis</i>	p = 0,001	Muu	Aed
Juur	Otu1396	<i>Ascomycota</i>	p = 0,002	Muu	Kasvuhoone
Juur	Otu1446	<i>Herpotrichia</i>	p = 0,001	Est	Aed

Lisa 2. Peremeestaimede fülogeneesipuu topoloogia



Lisa 3. Üldise lineaarse analüüsi tulemused.

Sõltuvaks muutujaks oli valitud OTU_{RES}. PCNM on fülogeneesivektorid ning PCOR ruumivektorid. Koht (K) tähistab proovide korjamise kohta (aed/kasvuhoone), tüüp (T) tähistab proovi tüüpi (leht/juur), mükoriisa (M) tähistab taime mükoriisset tüüpi (ektomükoriisa/muu).

Faktor	SS	df	MS	F	P	Partial eta-squared	Non-centrality	Observed power ($\alpha = 0,05$)
PCNM17	980,58	1	980,575	3,897	0,049	0,013537	3,89739	0,503
PCNM27	550,60	1	550,596	2,188	0,140	0,007647	2,18840	0,314
PCNM37	1376,68	1	1376,680	5,472	0,02	0,018903	5,47174	0,645
PCNM46	854,01	1	854,014	3,394	0,066	0,011811	3,39436	0,451
PCNM65	1065,33	1	1065,326	4,234	0,041	0,014690	4,23424	0,536
PCOR3	911,10	1	911,101	3,621	0,058	0,012590	3,62126	0,475
PCOR11	794,40	1	794,401	3,157	0,077	0,010995	3,15742	0,425
PCOR24	587,85	1	587,851	2,336	0,127	0,008160	2,33647	0,331
Koht	1633,70	1	1633,701	6,493	0,011	0,022353	6,49330	0,719
Tüüp	6178,65	1	6178,650	24,558	>0,001	0,079588	24,55762	0,999
Mükoriisa	38,05	1	38,052	0,151	0,698	0,000532	0,15124	0,067
K*T	2116,73	1	2116,732	8,413	0,004	0,028771	8,41315	0,824
K*M	698,37	1	698,370	2,776	0,097	0,009679	2,77574	0,382
T*M	53,50	1	53,503	0,213	0,645	0,000748	0,21265	0,075
K*T*M	66,02	1	66,021	0,262	0,609	0,000923	0,26241	0,080

Lihlitsents

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kai Ilves,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose

„Tartu Ülikooli Botaanikaaiia puittaimede endofüütsed seemned“, mille juhendaja on Leho Tedersoo,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kai Ilves
24.05.2019