

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Krõõt Arbo

Endofüütsed bakterid Eestis kasvatatavates juurviljades

Magistritöö (30EAP)

Juhendajad

Viia Kõiv, MSc

vanemteadur Ülo Maiväli, PhD

TARTU 2017

Endofüütsed bakterid Eestis kasvatatavates juurviljades

Lühikokkuvõte. Antud töös uuriti viie Eestis kasvatatava juurvilja koore ja sisu bakterite kooslusi ning optimeeriti katsesüsteemi, eesmärgiga saavutada esinduslik valim juurviljade endofüütsete bakterite liigirikkusest. Selleks kasutati kahte erinevat DNA eraldamismeetodit ja bakterite identifitseerimiseks amplifitseeriti PCR 16S rDNA V4 hüpervariaabel regiooni, mis sekveneeriti Illumina MiSeq tehnoloogiaga. Kahe erineva DNA eraldamismeetodiga õnnestus samadest proovidest identifitseerida olulisel määral erinevad bakteriliigid. Analüüs näitas, et juurviljade koore endofüütsete bakterite kooslused on mitmekesisemad, kui sisu omad. Kõikide juurviljade kooses kui ka sisus domineerisid *Gammaproteobacteria* esindajad. Kooses oli rohkem *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria* ja *Bacteroidetese* esindajaid. Sisus oli lisaks gammaproteobakteritele ka klass *Bacilli* esindajaid. Tööst selgus, et juurviljade mikrobiom on väga mitmekesine ja oluline on jätkata nende edasist uurimist.

Märksõnad: juurviljad, endofüüdid, mikrobiom, Illumina, DNA ekstraheerimine

CERCS kood: B230 - Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Endophytic bacteria in root vegetables cultivated in Estonia

Abstract. Here we describe the endophytic bacterial microbiomes of five vegetables cultivated in Estonia (turnip, potato, beet root, carrot, Jerusalem artichoke), collected separately from peel and inner content cultivated. We applied two different DNA extraction methods and used sequenced PCR amplicon of 16S rDNA (V4 region) with the Illumina MiSeq technology. Data quality from two different DNA extraction methods samples differed substantially in sequence numbers and quality. *Gammaproteobacteria* was the most dominant group in both peel and content. In peels there were diverse *Alphaproteobacteria* population in all vegetables. In turnip, potato, beet root and carrot peels there were diverse *Actinobacteria* population. In Jerusalem artichokes peel contained considerable amounts of *Betaproteobacteria* species. In content there were also representatives of *Bacilli*. My study demonstrated that there is a diverse bacterial microbiome in vegetable peels and contents. It is therefore important to continue research on vegetables microbiomes and its interaction with human microbiome.

Keywords: vegetables, endophytes, microbiome, Illumina, DNA extraction

CERCS code: B230 - Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1. Kes on endofüüdid?.....	8
1.2. Kus leidub endofüüte?.....	9
1.3. Risosfääri roll taime mikrobioomi omastamises.....	9
1.4. Taimede juurte endofüüne mikrobioom.....	13
1.5. Inimese soole mikrobioom ja dieet.....	14
2. Eksperimentaalne osa.....	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.2. Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1. Proovide kogumine ja ettevalmistus analüüsiks.....	18
2.2.2. DNA eraldamine.....	19
2.2.3. DNA fragmentide amplifitseerimine, kontrollimine ja puhastamine.....	19
2.2.4. Sekveneerimine ja sekveneerimisandmete töötlus.....	21
2.2.5. Statistiline analüüs.....	21
2.3. Tulemused.....	22
2.3.1. Sekveneerimisandmete kvaliteet.....	24
2.3.2. Suhteline mitmekesisus.....	25
2.3.3. Bakteriaalne mitmekesisus.....	26
2.3.4. OTUde vahelised seosed juurviljade koortes ja sisudes.....	31
2.4. Arutelu.....	32
Kokkuvõte.....	36
<i>Endophytic bacteria in root vegetables cultivated in Estonia</i>	37
Tänuavaldused.....	38
Kasutatud kirjandus.....	39
Lisa 1. Kõikide (esimene+teine) sekveneerimisandmete kirjeldus proovides.....	54
Lisa 2. Esimese sekveneerimise andmete kirjeldus proovides.....	56
Lisa 3. Teise sekveneerimise andmete kirjeldus proovides.....	58
Lisa 4. Shannon-Weaver indeksid kahe sekveneerimise proovides.....	60
Lisa 5. Juurvilja isendite koore ja sisu Shannon-Weaver indeksid.....	61
Lisa 6. Juurviljade koore ja sisu Shannon-Weaver indeksid.....	62
Lisa 7. I ja II sekveneerimise andmete mitokondri OTUde jaotus (näidatud ainult kolm suuremat OTUt).....	63

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks...64

Kasutatud lühendid

H' Shannon-Weaver indeks

LPS lipopolüsahhariidid

OTU ingl k *operational taxonomic units*

PNA ingl k *petide nucleic acid*

ROS reaktiivsed hapnikuühendid

SCFA ingl k *small chain fatty acid*

SILVA ribosomaalsete RNA järjestuste andmebaas

SparCC ingl k *Sparse Correlation for Compositional data*

Sissejuhatus

Maismaa taimede elupaigaks on muld, mis on üks kõige suurema prokarüootse mitmekesisusega bioome meie planeedil. Seal hinnatakse bakterite mitmekesisust kuni 38 000 taksonit mulla grammi kohta (Curtis jt., 2002). Sellest tulenevalt puutuvad taimed kokku suure hulga bakteritega, kes on võimelised sisenema taimedesse ja elama seal endofüütidena. Muld on taimede primaarne endofüütide allikas (Reinhold-Hurek jt., 2015). Taimed kasutavad mullas olevaid mikroobe, et ehitada üles endale iseloomulik mikrobioom (Edwards jt., 2015). Kuigi endofüüte leidub kõikides taimeosades, siis kõige tihedamad populatsioonid on taime juurtes (Chi jt., 2005). Tavaliselt sisaldavad juure mikrobioomid *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ja *Bacteroidetes* hõimkonna esindajaid (Miliute jt., 2015).

Hetkel on juurte endofüütide uurimused keskendunud peamiselt maailma mastaabis oluliste põllumajandustaimede nagu riis (Edwards jt., 2015), nisu (Rascovan jt., 2016), mais (Rosenblueth ja Martínez-Romero, 2004) ja sojauba (Rascovan jt., 2016) juurte mikrobioomi uurimisele. Neid taimi süüakse eelkõige töödeldud kujul ja inimesed ei puutu kokku nendes elavate bakteritega. 1998 aastal postuleeris rootsi arst Agnes Wold soole mitmekesisuse vähenemise hüpoteesi, mis seostas vähest kokkupuudet keskkonna ja toidu mikroobidega “ebanormaalse” mikrobioomi tekkimisega (Wold, 1998). Soolestiku mikrobioomil on aga oluline roll inimese immuunsüsteemi välja kujunemisel ja hoidmisel (Thaiss jt., 2016). Inimese toidulaual on hulk juurvilju, mille söödavad osad on otseses kontaktis mulla mitmekesise mikrobioomiga nagu näiteks kartul, kaalikas, porgand, peet, maapirn, redis, bataat ja pastinaak. Kuna suurem osa endofüüte siseneb taimedesse juurte kaudu on juurviljad oluline elupaik endofüütidele ning võivad olla ühed kõige mitmekesisema mikroobi kooslusega toidud meie köögis. Nimetatud juurviljad on toidulaual nii töödeldud kui töötlemata kujul ja neid süüakse nii koore kui kooreta. Kõige rohkem on uuritud kartuli (Garbeva jt., 2001; Sessitsch jt., 2002; Kõiv jt., 2015) mikrobioomi ning mõned uurimused on ka porgandi (Nithya ja Babu, 2017), redise (Seo jt., 2010), suhkrupeedi (Shi jt., 2014) mikrobioomi kohta. Enamus uurimusi keskenduvad kogu mikrobioomi kirjeldamisele või mõnele kindlale taksonile ega vaata eraldi koore ja sisu mikrobioomi, mis söömise puhul on oluline.

Sellest tulenevalt uuriti viie juurvilja liigi (kaalikas, kartul, peet, porgand, topinambur) koore ja sisu endofüütsete bakterite mitmekesisust. Juurviljadest bakteriaalse DNA eraldamiseks kasutati kahte erinevat DNA eraldamise meetodit ja bakterite identifitseerimiseks amplifitseeriti PCR 16S rDNA V4 hüpervariaabel regiooni, mis sekveneeriti Illumina MiSeq

tehnoloogiaga. Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi antibiootikumide uurimisgrupis.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Kes on endofüüdid?

Otsetõlkes on endofüüdid organismid, kes elavad taimedes (*endon* kreeka keel - sees; *phyton* kreeka keel - taim) (Chanway, 1996). Esmakordselt kirjeldas endofüüte saksa botaanik Heinrich Friedrich Link aastal 1809. Sel ajal nimetati neid „Endophytae“ ja nende hulka kuulusid taimedes elavad parasiitsed seened. Sellest ajast alates on endofüüdi definitsioon muutunud, kuid kaua aega olid endofüüdid peamiselt patogeensed või parasiitsed organismid, enamasti seened (Hardoim jt., 2015). 1866. aastal defineeris De Bary endofüüdi kui patogeense seene, kes siseneb taime kudedesse. Hiljem laienes see definitsioon ka teistele taime kudedesse sisenevatele organismidele (Petrini, 1991; Compant, 2012; Stępniewska ja Kuźniar, 2013). 1887 aastal teatas M.L.V Galippe esimese teadlasena, et mitmete juurviljade sees elavad mullast põlvnenud ja taimedesse migreerunud mikroobid, kellel võib olla peremeestaimedele kasulik roll (Compant, 2012; Stępniewska ja Kuźniar, 2013). 1888. aastal avastas Hollandi mikrobioloog Martinus Willem Beijerinck bakterid liblikõieliste mügaratest. Hiljem klassifitseeriti need atmosfääri lämmastikku siduvad bakterid *Rhizobium leguminosarum*-ina (Hardoim jt., 2015). Kuigi oli veel uurimusi, mis kinnitasid endofüütide olemasolu tervetes taimedes, säilisid 19.sajandi lõpus ja 20. sajandi esimesel poolel siiski vastakad arvamused endofüütide olemasolu suhtes (Hardoim jt., 2015) ning üldiselt arvati, et normaalselt kasvavad taimed on steriilsed ja mikroorganismide vabad (Compant, 2012).

Alles 1991 defineeris Orlando Petrini endofüüdid kui „kõik organismid, kes asustavad taimeorganeid mingil eluetapil ja suudavad koloniseerida taime sisemisi kudesid ilma silmnähtavat kahju tekitamata“ (Petrini, 1991). Sellest ajast alates on sõnastatud mitmeid endofüüdi definitsioone (Wilson, 1995; Hallman jt., 1997; Azevedo jt., 2000; Sessitsch jt., 2002; Rosenblueth ja Martínez-Romero, 2006; Schulz ja Boyle, 2006; Patil ja Rawal, 2008; Miliute jt., 2015), mis kõik on peamiselt seotud mikroorganismidega, kes osa või kogu elu veedavad elusa taime kudedes, tekitamata peremehele haigusi. See definitsioon on olnud aluseks paljudele uuringutele, kuid kuna selle definitsiooniga eristatakse selgelt endofüüte ja patogeene, siis on see tõstatanud mitmeid küsimusi. Esiteks, sobib see definitsioon rohkem kultiveeritavatele bakteritele, kellel on võimalik tuvastada patogeensus. Enamasti patogeensusanalüüse ei tehta või tehakse ainult ühe liigi suhtes, samuti võib patogeensus avalduda teise genotüübi puhul või teistsugustel tingimustel. Teiseks, mõned patogeenid võivad elada taimedes latentsete patogeenidena ja ainult teatud tingimustel käituda patogeenina (Kloepper jt., 2013) või on patogeenid ainult ühele liigile. Kolmandaks, võib bakteri tüvi olla ühele liigile patogeene, aga teisele liigile kasulik, näiteks taime kasvu soodustav (Di Fiore ja Gallo, 1995; Coombs ja Franco, 2003). Need avastused

demonstreerivad, et mittepatogeensete endofüütide eristamine patogeensetest on lihtsustatud käsitlus ning patogeensus ja mutualism võivad sõltuda erinevatest teguritest. Praegusel ajal on kultiveerimisest sõltumatute analüüsidega veelgi raskem kindlaks teha mikrobioomi liikme patogeensust (Hardoim jt., 2015). Seega, Hardoim jt. (2015) arvavad, et endofüüdi definitsioon peaks lähtuma elupaigast, mitte funktsioonist. Termin peaks olema üldisem ja kaasama kõiki mikroorganisme, kes kogu või osa enda eluajast koloniseerivad taime seesmisi kudesid. Praegusel ajal ongi välja kujunenud arusaam, et taim on peremeheks erinevat tüüpi mikroobsetele endofüütidele – bakterid, seened, arhed ja üherakulised eukarüoodid nagu vetikad (Trémouillaux-Guiller jt., 2002) ja algloomad (Müller ja Döring, 2009).

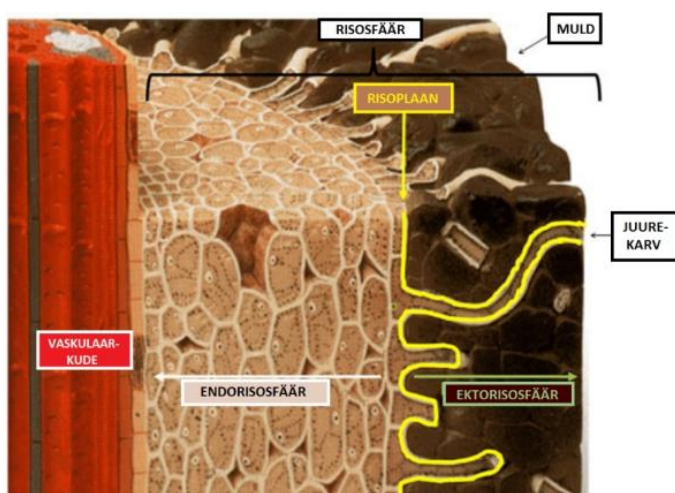
1.2 Kus leidub endofüüte?

Endofüütseid mikroorganisme on isoleeritud peaaegu kõikidest teadaolevatest taimedest, mis kasvavad põllul või potimullas (Sturz jt., 2000). Maapeal on üle 300 000 taimeliigi ja igaüks neist võib olla peremeheks ühele või mitmele endofüüdile (Strobel ja Daisy, 2003). Kõik taimedega seotud mikrokeskkonnad on koloniseeritud erinevate mikroorganismide poolt (Berg ja Smalla, 2009; Mendes jt., 2011, 2013). Endofüüte on isoleeritud juurtest (Bulgari jt., 2012; Munif jt., 2012; McInroy ja Kloepper, 1995), võsust (McInroy ja Kloepper, 1995), lehtedest (Bhore jt., 2010), õisikutest (Compant jt., 2011), viljadest (Compant jt., 2011), juurviljadest (Sessitsch jt., 2002; Zachow jt., 2008), seemnetest (Compant jt., 2011) ja õietolmu teradest (Förnkrantz jt., 2012). Neid on leitud nii üheidulehelistest taimedest nagu riis (Edwards jt., 2015), nisu, mais (Zinniel jt., 2002), karjamaa-raihein, suhkruroog (Gangwar ja Kaur, 2009) kui ka kaheidulehelistest taimedest nagu sojauba (Zinniel jt., 2002), harilik aeduba (de Oliveira Costa jt., 2012) ja pappel (Gottel jt., 2011). Endofüüdid koloniseerivad taimerakkude vahelisi alasid, apoplasti ja ka vaskulaarkude, kaasa arvatud ksüleemi (Compant jt., 2011).

1.3 Risosfääri roll taime mikrobioomi omastamises

Maismaataimede peamine elukeskkond on väga rikkaliku mikroobikooslusega muld (Tringe jt., 2005). Juurtel on suur mõju mulla bioloogilisele aktiivsusele ja mulla struktuurile (Reinhold-Hurek jt., 2015). Juurte eritised sisaldavad väga palju erinevaid molekule nagu süsivesikud, aminohapped, orgaanilise happe ioonid, vitamiinid ning lisaks sellele eralduvad mulda juurekübara äärmised rakud ja polüsahhariidid, mis teevad juured mikroobidele väga atraktiivseks ja toitainerikkaks elupaigaks (Bertin jt., 2003; Bais jt., 2006; Reinhold-Hurek jt., 2015).

Selleks, et mõista endofüütide päritolu ja seda, kuidas nad taime kudedesse jõuavad, on oluline määratleda risosfääri definitsioon ja selle erinevad osad (Joonis 1). Risosfääriks nimetatakse juurt koos seda ümbritseva kitsa mulla tsooniga, mis on mõjutatud juurte süsteemist ning mõjutab mulla mikroorganisme (Reinhold-Hurek jt., 2015). Risosfääri saab omakorda jagada ekto- ja endorisosfääriks, mille vahele jääb risoplaan, mis on vahepealne osa koos juure epidermise ja polüsahhariidse kihiga (McNear, 2013). Endorisosfäär moodustub juure sisemistest kudedest - kõik, mis jääb risoplaanist sissepoole (Reinhold-Hurek jt., 2015). Ektorisosfäär koosneb risosfääri mullast ja risoplaanist. Risosfääri mõistet kasutatakse erinevates kontekstides, seega on uurimustes oluline määratleda juure tsoonid ja risosfääri mõiste. Juhul kui katse käigus pole risoplaan ja endorisosfäär teineteisest eraldatud, siis on uuritud juurega seotud mikroobe. Endorisosfääri uurimisel on oluline eemaldada kõik pealmised mikroorganismid (ka need, kes pesitsevad risoplaanis), samal ajal kahjustamata endorisosfääri kooslust (Reinhold-Hurek jt., 2015).



Joonis 1. Juure läbilõike skeem, mis näitab risosfääri struktuuri (McNear, 2013)

Risosfääri muld on taime juurtest mõjutatud (Reinhold-Hurek jt., 2015) ning seda peetakse endofüütsete bakterite primaarseks allikaks (De Boer ja Copeman, 1974; Sturz, 1995; Sturz jt., 1998). Kõige rohkem mõjutab taimede mikrobioomi mulla tüüp (Tan jt., 2003; Costa jt., 2006; Schreiter jt., 2014). Katsed riisitaimedega näitasid, et taimede mikrobiom ei ole piiratud kindlate liikidega, vaid taimed kasutavad erinevaid mullas olemasolevaid baktereid, et üles ehitada enda mikrobiom (Edwards jt., 2015). Siiski omastavad erineva genotüübiga taimed samades keskkonnatingimustes endale iseloomuliku bakteriaalse mikrobioomi, mis näitab, et taime genotüübil on suur roll mikrobioomi moodustumisel (Reinhold-Hurek ja Hurek, 2011). On leitud, et samas mullas kasvavate taimede mikrobiom võib varieeruda nii

taime perekondade (Smalla jt, 2001), liikide (Tan jt., 2003), alamliikide (Sessitsch jt., 2002; Andreote jt., 2010; Hardoim jt., 2011) kui ka sordi tasandil (Knauth jt., 2005).

Taime juureeritised ja teised risodeposiidid meelitavad ligi mikroobe, mis on kohastunud risosfääris elamiseks (Berendsen jt., 2012). Risosfääri mikroobide koosseisu mõjutab ka juureeritiste koostis (Bais jt., 2006; Doornbos jt., 2012). Näiteks nisu, maisi, rapsi ja *Medicago truncatula* juureeritised vormivad oluliselt bakteriaalse koosluse struktuuri mullas (Haichar jt., 2008). Juure koloniseerimiseks vajalikud geenid aktiveeritakse juureeritiste ja ekstraktid juuresolekul (Shidore jt., 2012; Coutinho jt., 2015). Seega juba risosfääri mullas toimub ettevalmistus juure koloniseerimiseks. Juurte koloniseerimine on aktiivne protsess, milleks bakteritel on taimekoesse tungimiseks vaja spetsiifilisi omadusi (Reinhold-Hurek ja Hurek, 2011). Potentsiaalsed koloniseerijad leiavad peremehe kemotaksise, elektritaksise või juhusliku kohtumise läbi (Bashan 1986; You jt., 1995). Efektiivseks endofüütseks koloniseerimiseks on vaja bakterirakul pinna omadusi nagu vastav lipopolüsahhariidide koostis (Balsanelli jt., 2010), taime polümeere lagundavaid ensüüme nagu tsellulaas või pektinaas (Compant jt., 2005) ning mehhanisme taime kaitsevõime mahasurumiseks (Reinhold-Hurek jt., 2015).

Juurte pinna koloniseerimine on oluline ühedusaste ja eeldus taimede sisemiste kudede koloniseerimiseks (Dörr jt., 1998; Reinhold-Hurek jt., 2006). *Alcaligenes faecalis* kinnitumisel riisi juure pinnale saab eristada kolme etappi: 1) bakterite adsorptsioon riisi juurte pinnale, mis on kiire, aga nõrk interaktsioon bakteri ja peremeestaime vahel; 2) kinnitumine juure pinnale, mis on tugev interaktsioon; 3) juure pinna koloniseerimine ja mõnede bakterirakkude sisenemine riisi juurtesse (You jt., 1995). Sarnane kinnitumisviis on leitud ka *Azospirillum brasilense* sisenemisel nisu juurtesse (Bashan ja Holguin, 1993). Üldiselt sisenevad bakterid taime koesse õhulõhede, lõhede, haavade (kaasa arvatud katkised trihhoomid), lateraalsete juurte tekkimise alade või idanenud seemne idujuure kaudu (Huang, 1986). Siiski tundub endofüütide peamine sisenemiskoht olevat haavad, mis tekivad loomulikult taime kasvu käigus, aga ka juurekarvad ja juurekübara piirkond (Sprent ja de Faria, 1988).

Juurte koloniseerimise kirjeldamiseks on välja pakutud erinevaid mitmeastmelisi mudeleid (Edwards jt., 2015; Reinhold-Hurek, 2015). Reinhold-Hurek jt. (2015) pakuvad välja kolmeastmelise mikroobikoosluse moodustumise mudeli (Joonis 2), võttes arvesse ka juure erinevaid nišše ja bakterite funktsioone. Nagu joonisel näha, väheneb bakterite mitmekesisus juure sisemuse poole järk-järgult ja suureneb spetsialiseerumine.

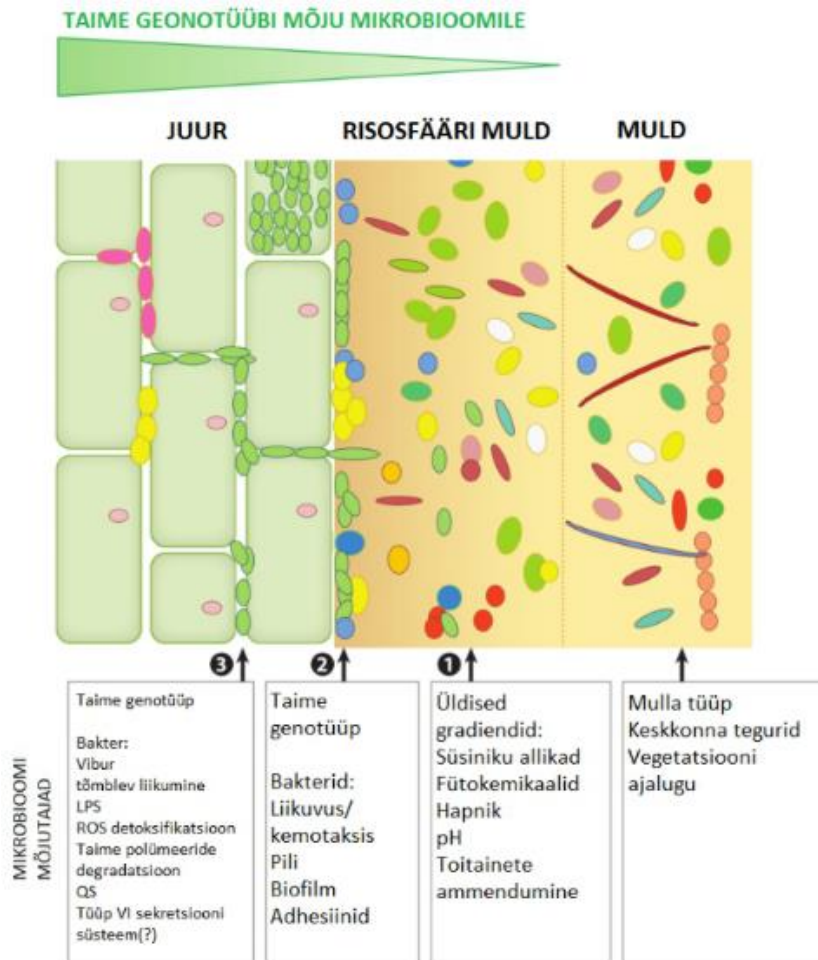
1. Esimese filtrina toimib risosfääri muld, kus toimub potentsiaalsete endofüütide „aktiveerimine“ ehk kolonisatsiooniks vajaminevate geenide ekspressioon. Tekivad süsiniku

allika olemasolu, hapnikusisalduse ja pH gradient. Selles faasis hakkab taime genoom mõjutama mikrobioomi koosseisu.

2. Risoplaanis on veelgi valitum kooslus. Toimib lähikontakt peremehe juure pinnal. Biofilmi moodustamine või spetsiifiline adhesiooni võib seda protsessi toetada. Taime genoomil on silmapaistev mõju mikrobioomile.

3. Endorisosfääri kooslus on kõige väiksema mitmekesisusega ja spetsialiseeritum. Ülekaalus on *Proteobacteria*, kes on tuntud kiiresti kasvavate bakteritena ja on potentsiaalselt kõrge metaboolse aktiivsusega. Sellesse tsooni sissetungimiseks on olulised spetsiifilised bakterite omadused. Võrreldes teiste osadega on siin peremehe genotüübil suurem mõju koosluse struktuurile.

Katsed riisitaimega näitasid, et mikrobioomi omastamine taime poolt on kiire protsess ja alates taime istutamisest steriilsest söötimest mulda kulus 13 päeva. Selleks ajaks saavutas taime mikrobioom püsiseisundi, mis oli sarnane 42 päeva vanuse mikrobioomiga (Edwards jt, 2015). Lisaks ei pärine endofüüdid ainult mullast, vaid nad võivad levida ka vertikaalselt seemnetega (Compant jt., 2010), vegetatiivsete taimeosadega (James ja Olivares, 1998; Reinhold-Hurek ja Hurek, 1998) või ka vektoritega nagu taimi koloniseerivad seened (Reinhold-Hurek ja Hurek, 2006).



Joonis 2. Kolme astmeline juure mikroorganismide koloniseerimismudel. Puhtas mullas sõltub mikroobi kooslus mulla tüübist, keskkonna teguritest ja vegetatsiooni ajaloost. 1) Juure lähedal tekivad mulla gradiendid (nagu süsivesiniku varud/allikad ja fütokeemikaalid, hapniku ja pH gradiendid ning toitainete ammendumine) mõjutavad koosluse struktuuri ning taime genotüübi mõju on suhteliselt väike. 2) Spetsialiseeritum kooslus, keda mõjutavad spetsiifilised taime genotüübi faktorid. 3) Endorhisofäär – kõige väiksema mitmekesisusega kooslus. Bakteritel on vaja kindlaid omadusi, et tungida ja jääda elama sellesse ossa. Siin on peremehe genotüübil kõige suurem mõju koosluse struktuurile võrreldes teiste osadega. Lühendid: LPS, lipopolüsahhariidid; ROS, reaktiivsed hapnikuühendid (Reinhold-Hurek jt., 2015).

1.4 Taimede juurte endofüütne mikrobiom

Endofüütsete bakterite populatsiooni tihedus on erinevatel taimedel väga varieeruvad. On leitud 10^2 - 9×10^9 bakterit/grammi taimekoe kohta (Jacobs jt., 1985; Misaghi ja Donndelinger, 1990; Chi jt., 2005). Tihedamaid populatsioone võib leida taime juurtes ja teistes maa-alustes kudedes võrreldes maapealsete kudedega (Chi jt., 2005).

Taimejuurte mikrobiom erineb mulla mikrobiomist. Metagenoomi analüüsis võrreldi nisu ja kurgi pestud juurte mikrobioomi puhta mulla omaga ning leiti, et juurtes domineerisid

Proteobacteria (80%) ja mullas *Actinobacteria* (40%) liigid. Kõige suurem erinevus esines *Gammaproteobacteria* (5.1% mullas, 25.2% juurtes) puhul ja ka *Alphaproteobacteria* liike oli juurtes 1.5 korda rohkem kui mullas (Ofek-Lalzar jt., 2014). Ka riisi juure metagenoomi uurimuses leiti, et *Proteobacteria* on kõige arvukam riisi juures esinev hõimkond (90%), mis peamiselt sisaldas *Gammaproteobacteria* klassi ja koosnes põhiliselt *Enterobacteriga* seotud endofüütidest ning ka *Alphaproteobacteriast*, kuhu kuulvad *Rhizobia* perekonna esindajad (50% endofüütidest olid lämmastikku siduvad mikroobid) (Sessitsch jt., 2012). Teises uurimuses leiti, et riisi mikrobiom koosneb eelkõige *Proteobacteria*, *Chloroflexi* ja *Acidobacteria* hõimkondadest (Edwards jt., 2015). Miliute jt. (2015) koostatud oluliste põllumajandustaimede endofüütsete mikrobiomide koondtabelis domineerivad erinevad *Proteobacteria* klassid, *Firmicutes* ja *Actinobacteria*. Taimedes on mõned bakterite liigid üldlevinud ja neid võib leida kogu taimest, tuntumad taimedega seotud perekonnad on *Bacillus* ja *Pseudomonas* (Bouizgarne, 2013). Mõlema perekonna puhul on näidatud võimet taimi haiguste eest kaitsta (Ramette jt., 2011; Fiqueredo jt., 2017).

Edwards jt., (2015) leidsid uurimuses, kus nad kasvasid riisi taimi erinevat tüüpi mullaga põldudel, et taime liikidel võib olla ainult neile iseloomulik mikrobiom, mille liigid on alati taimes kohal ja moodustavad taime tuumik mikrobiomi. Riisi puhul on leitud, et tuumik mikrobiom võib olla 32 OTU-st (ingl k *operational taxonomic units*) koosnev kooslus, mille liigid kuuluvad *Deltaproteobacteria* hõimkonna *Anaeromyxobacter*, *Spirohaetes* perekondadesse ja *Actinobacteria* hõimkonda ning *Alphaproteobacteria* sugukonda *Methylocystaceae*. Lisaks tuumik mikrobiomile võivad taime koloniseerida ka teised liigid (Edwards jt., 2015).

1.5 Inimese soole mikrobiom ja dieet

Nii inimestel kui taimedel on kompleksne mikrobiom, mis on mõjutatud nii elukeskkonnast kui ka peremehe sisemistest teguritest (Hacquard jt., 2015). Kui taimede mikrobiomi primaarseks mõjutajaks on mulla tüüp, millest ta saab eluks vajalikke toitaineid, siis inimese soolestiku mikrobiom saab eluks vajaliku energia tema toidust. Hiljutised uuringud on kinnitanud selget seost inimese soole mikrobiomi ja dieedi vahel (Wu jt., 2011; Claesson jt., 2012; David jt., 2013). Kuna taimed on inimese dieedi osa, siis võib järeldada, et taimedes elavad bakterid mõjutavad inimese soole mikrobiomi koostist.

Inimese soole mikrobiomi mõjutab lisaks dieedile peremehe genotüüp, vanus, sugu ja elustiil (Moschen jt., 2012). Nagu taimedel on ka inimestel täheldatud tuumik-mikrobiomi olemasolu st. mikroobe, mis on olemas kõikidel või vähemalt enamikel inimestel (Tap jt.,

2009; Huse jt., 2012; Shade ja Handelsman, 2012). Tuumikmikrobioom moodustab soole mikrobioomist ainult osa, ülejäänud mikroobid on peremehest sõltuvad, väga varieeruvad ning mõjutatud geneetilistest ja keskkonna teguritest (Moschen jt, 2012). Enamik täiskasvanu soole mikrobioomi bakteritest kuulub ühte neist neljast hõimkonnast: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* või *Bacteroidetes* (Costello jt., 2009). Teatud mikroorganismid nagu bifidobakterid ja *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol jt., 2008) peetakse toitumise ja tervisele kasulikuks, kuigi tõendusmaterjal ja mehaanilised alused nende kasulikkusest on puudulikud ja mõnel juhul kaheti mõistetavad. Samas on soolestiku mikrobioomis organisme, kes on kahjuliku mõjuga, kas siis ainevahetuse produktide, geeniproductide või potentsiaalse patogeensuse läbi (Blaser ja Kirschner, 2007). Tasakaal kasu ja kahju vahel peremehele sõltub üldisest mikrobioomi seisundist: jaotusest, mitmekesisusest, liigilisest koosseisust ja ainevahetusproduktidest (Flint jt., 2012).

Mikroobid koloniseerivad kogu inimese seedetrakti suuõõnest pärasoolde. Koloniseerimise tihedus ja koosseis erinevad märgatavalt anatoomiliste osade vahel ning sõltuvad transiidi määrast, peremehe eritistest, keskkonna tingimustest, substraadi kättesaadavusest ja sooleseina korraldustest. Magu ja peensool toetavad suhteliselt väheste mikroorganismide kasvu, kes suudavad taluda madalat pHd, hapniku kokkupuudet ja suhteliselt kiiret transiidi määra, mis valitsevad nendes piirkondades. Kontrastiks soodustab jämesool äärmiselt tihedalt kasvavat mikrobikooslust, kus domineerivad obligaatset anaeroobset bakterid. Inimese soole mikrobioomi uuringud toetuvad tavaliselt fekaalproovidele, mis kajastavad distaalse käärsoole mikrobioomi, kuid ei võimalda juurdepääsu toidu käärmise tegeliku paiga (proksimaalse käärsoole) mikrobioomile. Jämesoole bakterid saavad enda energia seedimatute dieedi koostisosade või peremehe sekreetide (peamiselt mutsiini) kääritamisel, mille peamisteks saadusteks on SCFA (ing k *small chain fatty acid*) atsetaat, propionaat ja butüraat koos H₂, CO₂, CH₄ ja H₂S gaasidega. Anaeroobsete mikrobikoosluste ainevahetus on väga läbi põimunud, kus erinevad organismid toituvad üksteise ainevahetusproduktidest (Flint jt., 2007). Tähelepanuväärne on see, et kuigi mikrobioomi liigilisel koosseisul on oma roll (Walker jt., 2005), siis on hoopis substraat see, mis määrab ainevahetuse väljundid koosluses (Louis jt., 2007).

Toidu koostisosad, mida inimesed ei suuda seedida on substraadiks soole mikrobioomile. Nn seedimatu toidu süsivesikute hulka kuuluvad resistentne tärklis, taime rakukesta materjal (tselluloos, pektiin) ja oligosahhariidid (Cummings ja Macfarlane, 1991). *In vitro* mudelsüsteemides on näitadatud, et spetsialiseeritud bakterite rühmad osalevad nende struktuuride lagundamises (Leitch jt., 2007). Kuna bakterid on spetsialiseerunud erinevate

substraatide kääritamisele, siis saavad mitmekülgsed dieetid bakteritele pakkuda erinevaid kasvu soodustavaid ja pärssivaid aineid, mille tagajärjel tekib inimese soolestikus spetsiifiline fülotüüp. Näiteks, *Ruminococcus bromii*, mis kuulub Firmicutese hõimkonda on resistentse tärklise osakeste esmalagundaja, tehes substraadi kättesaadavaks teistele bakteritele (Ze jt., 2012).

Bakterite fermentatsiooni lõpp-produktid lühikese ahelaga rasvhapped (butüraat, propionaat, atsetaat) on eluliselt tähtsad inimese tervisele. Põhilised butüraadi tootjad sooles on hõimkond *Firmicutes* esindajad. Butüraat on jämesoole epiteelrakkude esmane energiaallikas, surub alla põletiku ja on ka vähivastase toimega läbi immuunsüsteemi mõjutamise (Flint jt., 2012).

Propionaati toodavad põhiliselt hõimkond *Bacteroidetes* esindajad. Ka propionaat mõjutab immuunsüsteemi. Atsetaat, mida toodavad peaaegu kõik soole käärivad bakterid sealhulgas *E. coli*, on lipogeneesi ja glükoneogeneesi substraadiks bakteritele (Canfora jt. 2015).

Atsetaat on peaaegu alati kõrgeima kontsentratsiooniga fekaalsetes SCFA-des, on samuti vaheühend, mida tarbivad peamised butüraati tootvad bakterid (Louis ja Flint, 2009).

Paljud inimese mikrobioomis leiduvaid kasulikke bakterid leidub ka looduslikus keskkonnas väljaspool inimorganismi, näiteks bifidobaktereid leidub risosfääris ja piimhappe baktereid on palju taimede fülloosfääris (Teixeira jt, 2010; Vokou jt, 2012). Samuti on leitud, et maapiirkondade õhu proovides on rohkem inimese naha ja soole mikrobioomiga seotud mikroobe, mis kuuluvad *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ja *Proteobacteria* hõimkondadesse (Bowers jt, 2013).

Mikrobioloog René J. Dubos arvas juba 1960. aastatel, et vähene kontakt keskkonnas olevate mikroobidega võib seada ohtu normaalse immuunsüsteemi arengu (Logan jt, 2015). Tema teooria avaldati 16 aastat enne niinimetatud „hügeeni hüpoteesi“, milles seostati allergiate esinemise tõusu varases lapsepõlves liiga vähese kokkupuutega mikroobidega, mis on liiga sanitaarse elutingimuste, antibiootikumide kasutamise ja väiksemate perekondade tagajärg (Strachan, 1989). René J. Dubos juhitud murranguline uurimus 1960. aastatel näitas, kuidas hilisema ea tervis on seotud lapsepõlves kogetuga: toitumise, mikroobide, stressi ja teiste keskkonna teguritega (Logan jt., 2015). Dieet on arvatavasti kõige tähtsam faktor, mis mõjutab inimese soole mikrobioomi (Graf jt., 2015). Mõnel dieedil on efekt soole mikrobioomile lühiajaline, teistel võib mõju mikrobioomile olla pikaajalisem (Wu jt., 2011; Claesson jt., 2012). Inimese soole mikrobioom suudab kiiresti kohaneda erinevate dieedi

muutustega, nagu üleminek omnivoorelt dieedilt herbivoorsele või vastupidi (Kabeerdoss jt., 2012; Matijašić jt., 2014).

Taimede mikrobiomi on uuritud aastakümneid, kuid säilitusjuurviljade mikrobioloogilist koostist ei ole keegi uurinud. Käesolevas töös tahan alustada selle lünga täitmist.

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

Minu magistritöö põhieesmärgiks oli kasutades 16S rDNA geenide sügavsekveneerimist välja töötada juurviljade endofüütsete bakterite uurimismetoodika ja seda optimeerida.

Teiseks eesmärgiks oli leida ning testida sobivaid analüütilisi meetodeid kirjeldamiseks kaalika (*Brassica napus* spp. *napobrassica*), kartuli (*Solanum tuberosum*), peedi (*Beta vulgaris*), porgandi (*Daucus sativus*) ja maapirni (*Helianthus tuberosus*) endofüütsete bakterite mitmekesisust.

Käesolev töö on osa suuremast projektist, mis uurib bakterikooslusi erinevatel toiduks kasutatavatel juurviljadel ning nende bakterikoosluste liikmete edasikandumist toidu tarbija mikrobiomi.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Proovide kogumine ja ettevalmistus analüüsiks

Antud töös kasutatud juurviljadest porgand (*Daucus sativus*), peet (*Beta vulgaris*), kaalikas (*Brassica napus* spp. *napobrassica*) ja kartul (*Solanum tuberosum*) on kasvatatud mahekasvatusmeetoditega Tartumaal Võnnu vallas. Väetistest kasutati NPK 11-9-20, Cropcare 11-11-21, ALLGROW[®] bioplasma. Maapirn ehk topinambur (*Helianthus tuberosus*) on kasvatatud uudismaal Lääne-Virumaal, Vinni vallas, Vetiku külas. Porgandid, peedid, kaalikad ja kartulid hoiti pärast sügiskoristust kuni jaanuarini keldris ning edasi laboris +4° C juures külmkapis (kuni 2 nädalat) kuni proovide ettevalmistamiseni. Topinamburid kaevati välja 2015 aasta jaanuaris ja hoiti laboris +4° C juures külmkapis kuni proovide ettevalmistuseni. Igast liigist valiti uuringuks viis sarnase kuju ja suurusega juurikat. Enne koore ja sisu eraldamist pesti neid nõudepesuvahendiga (Fairy, Protect & Gamble), loputati kraaniveega, et eemaldada pealmine mustus ja hoiti kümme minutit destilleeritud vees. Seejärel eraldati iga juurvilja koor ja sisu ning purustati (riiviti riiviga või purustati küüslaugupressiga, mis olid mõlemad eelnevalt steriliseeritud) eraldi 50 ml-sesse Falcon tuubidesse. Igasse tuubi pandi 7 g proovimaterjali, kuhu lisati 7 ml steriilset destilleeritud vett. Tuube hoiti vaheldumisi jääl ning raputati vorteksil kümme minuti jooksul, seejärel pipeteeriti igast juurika proovist 1 ml vedelikku 1,5 ml-sse eppendorfi tuubi. Ülejäänud purustatud juurikate proovid säilitati samades Falcon tuubides -20° C juures.

Eppendorfi tuubidesse villitud juurikatest välja raputatud bakterite suspensiooni tsentrifuugiti 13 000 x g juures viis minutit (kõik selles töös tehtud tsentrifuugimised tehti Heraeus[®]

Biofuge[®] Pico-ga, Saksamaa), supernatant visati minema ning eppendorfi tuubi jäänud rakud külmutati -20°C juures kuni DNA eraldamiseni.

2.2.2 DNA eraldamine

DNA eraldati RTP[®]Bacteria DNA Mini Kit (Stratec Biomedical Systems, Saksamaa) abil vastavalt tootjapoolsele protokollile, ühe omapoolse lisandusega: ekstraktsiooni tuubi lisasime eelnevalt kuumkapis 300° C juures ~2 tundi steriliseeritud Zirconia/Silica pärleid (Biospec Products, USA): 0,1 mm – 0,5 g, ning enne rakkude lüüsimist homogeniseerisime segu FastPrep[®]-24 Instrument-iga (MP Biomedicals, USA) 4 m/s juures 3 x 60 sekundit. Kõik eelneva viis läbi Viia Kõiv.

Purustatud ja külmutatud juurikate proovidest eraldas Krõõt Arbo 2016. aastal veel teinegi kord bakteriaalset DNAd. Teine DNA eraldamine muudetud protokolliga otsustati teha, seetõttu, et esimese sekveneerimistulemuste kvaliteet oli halb.

Enne DNA ekstraheerimist, PCR segude segamist ja DNA puhastamist puhastati laboriruumi kümme minutit UV valgusega, et vähendada proovide juhuslikku saastumist. Bakteriaalse genoomse DNA eraldamiseks sulatati esmalt proovide tuubid jää peal üles. Seejärel segati neid vorteksil (kõik selles töös tehtud vorteksil segamised tehti IKA[®]Vortex 3-ga). DNA eraldati RTP[®]Bacteria DNA Mini Kit (Stratec Biomedical Systems, Saksamaa) abil vastavalt tootjapoolsele protokollile, koos mõnede muutustega protokollis. Ekstraktsiooni tuubi lisasime eelnevalt kuumkapis 300° C juures ~2 tundi steriliseeritud kahes erinevas läbimõõdus Zirconia/Silica pärleid (Biospec Products, USA): 0,1 mm – 0,5 g ja 0,5 mm – 0,5 g, seejärel homogeniseerisime segu FastPrep[®]-24 Instrumentiga (MP Biomedicals, USA) 4m/s juures 3 x 60 sekundit ja edasi kuumutasime proovi Biosan TS-100C termomikseriga (Biosan, Läti) vastavalt tootja protokollile ning pärast rakkude lüüsimist tegime kloroformi ekstraktsiooni, et vabaneda liigsetest taimsetest ühendidest, mis PCR reaktsiooni inhibeerivad. Selleks tsentrifuugiti proovi 13 000 x g juures üks minut ja supernatant pandi uude 1,5 ml eppendorfi tuubi, kuhu lisati 350 µl kloroformi ning sellele järgnes segamine vorteksil ja tsentrifuugimine 13 000 x g juures 5 minutit. Seejärel eraldati pealmine osa, kuhu jäi DNA, uude 1,5 ml eppendorfi tuubi ja järgiti edasi tootja poolset protokollile. DNA eraldamise edukust kontrolliti NanoDrop[®] 1000 Spectrophotometer-iga (Thermo Fischer Scientific, USA) 260/280nm juures.

2.2.3 DNA fragmentide amplifitseerimine, kontrollimine ja puhastamine

Edasi toimus DNA ettevalmistamine sekveneerimiseks. Selleks amplifitseeriti polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) 16S rDNA geeni piirkonna V4 regioon. Lõigu amplifitseerimiseks

kasutati praimereid F534adnov ja R783adnov (metabion international AG, Saksamaa) (Tabel 1).

Tabel 1. Kasutatud praimerid.

Praimeri nimi	Järjestus 5' - 3'	Allikas
F534adnov	TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCA GCA GCC GCG GTA AT	Sakai jt.(2004)
R783adnov	GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GAC CMG GGT ATC TAA TCC KG	Sakai jt.(2004)

PCR reaktsioonisegu mahuks oli 25 µl 3 korduses, mis koosnes: 1 x Maxima Hot Start Taq puhver (Thermo Fischer Scientific, USA); 0,2 mM dNTP (Thermo Fischer Scientific, USA); 0,3 pmol F534adnov praimerit; 0,3 pmol R783adnov praimerit; 2,5 mM MgCl₂ (Thermo Fischer Scientific, USA); 2,5 U Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific, USA); templina kasutati 30-40 ng DNAd ja lõppmahuni steriilset destilleeritud vett.

PCR viidi läbi Mastercycler[®] ep (Eppendorf, Saksamaa) PCR masinaga, kasutades järgnevat programmi:

- 1) Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 95°C juures 5 minutit.
- Järgmised kolm etappi kordusid 7 tsükli vältel:
- 2) Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 95°C juures 45 sekundit
 - 3) Praimerite seondumine DNA-ga 65°C juures 1 minut
 - 4) Uue DNA ahela süntees 72°C juures 1 minut ja 30 sekundit.
- Edasised kolm etappi kordusid 20 tsükli vältel:
- 5) Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 95°C juures 45 sekundit
 - 6) Praimerite seondumine DNA-ga 50°C juures 30 sekundit
 - 7) Uue DNA ahela süntees 72°C juures 1 minut ja 30 sekundit.
 - 8) Lõppekstensioon toimus 10 minuti jooksul 72°C juures.

Õige produkti olemasolu ja pikkust (~300 bp) ning negatiivse kontrolli puhtust kontrolliti geelelektroforeesil. Proovidele, mis ei andnud UV valguse all geelil tuvastatavat PCR produkti tehti uuesti PCR.

DNA puhastamiseks pandi 3 korduses tehtud 25 µl PCR-i produkti ühte eppendorfi tuubi. Puhastamiseks kasutati DNA Clean & Concentration[™]-5 kitti (Zymo Research, USA) ning

järgiti tootja poolset protokollit. Pärast puhastamist kontrolliti proove NanoDrop® 1000 Spectrophotometer-iga (Thermo Fischer Scientific, USA) 260/280nm juures. Seejärel saadeti proovid sekveneerimisse.

2.2.4 Sekveneerimine ja sekveneerimisandmete töötlus

Sekveneerimine viidi läbi tellimustööna Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu tuumiklaboris. Sekveneerimine teostati Illumina MiSeq Personal Sequencer sekvenaatoriga vastavalt Illumina tootja poolsele protokollile.

Saadud sekveneerimisandmed töödeldi Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi bioinformaatika laboris Märt Roosaare poolt. Trimmomatic programmi (Trimmomatic ver. 0.36; Bolger jt., 2014) abil filtreeriti ja puhastati toored lugemid, et eemaldada adapterid ja muud Illumina spetsiifilised järjestused, et eemaldada lugemid, kus on liialdaselt vigu või mis on poolikud. Parameetriteks olid: LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:6:25 MINLEN:100. Klasterdusprogrammiga cd-hit-otu (cd-hit-otu 0.0.1; Li jt., 2012) klasterdati sarnased lugemid 97% järejstuse sarnasuse alusel OTUdeks (ingl *k operational taxonomic units*). Saadud OTUde konsensusjärjestused identifitseeriti megablasti abil, kasutades SILVA 123 väikese subühiku (16S RNA) andmebaasi (SILVA andmebaas). Tulemuseks saadud tabelit OTUde arvukuse ja identiteediga kasutati statistilistes analüüsides.

2.2.5 Statistiline analüüs

Andmete analüüsiks kasutati statistika ja graafika programme R (R version 3.3.1) ja RStudio (RStudio version 0.99.902). Jooniste tegemiseks kasutati R paketti *ggplot2*. Statistilisteks analüüsideks kasutatud R-i *script* on kättesaadav veebiaadressil <https://github.com/kroota/vegetablesmicro>.

Peale algandmete analüüsi visati proovidest välja kõik OTUd, mida oli vähem kui 20 sekvensi ning leiti alles jäänud OTUde arv ja nende kuuluvus erinevatesse hõimkondadesse. Siis ülejäänud andmed normaliseeriti viisil, et igas proovis olevate lugemite summa võrduks sajaga. Seejärel summeeriti erineva DNA eraldamisega saadud proovid, mille tulemusel saadi andmekogu 50, kus iga andmepunkt võrdus ühe juurvilja prooviga. Peale seda summeeriti iga juurvilja liigi koore ja sisu proovid, mille tulemuseks oli andmekogu 10, mida kasutati erinevate juurvilja liikide sisu ja koore endofüütsete bakterite koosluste kirjeldamiseks.

Andmete mitmekesisuse hindamiseks kasutati Shannon-Weaver indeksid (H') (Shannon-Weaver, 1964), mille arvutamiseks kasutati R paketi *vegan* funktsiooni *diversity* () (Oksanen, 2016). Shannon-Weaver indeks (H') arvestab liikide arvukuste erinevusi. Liikide mitmekesisus arvutatakse valemist (Oksanen, 2016):

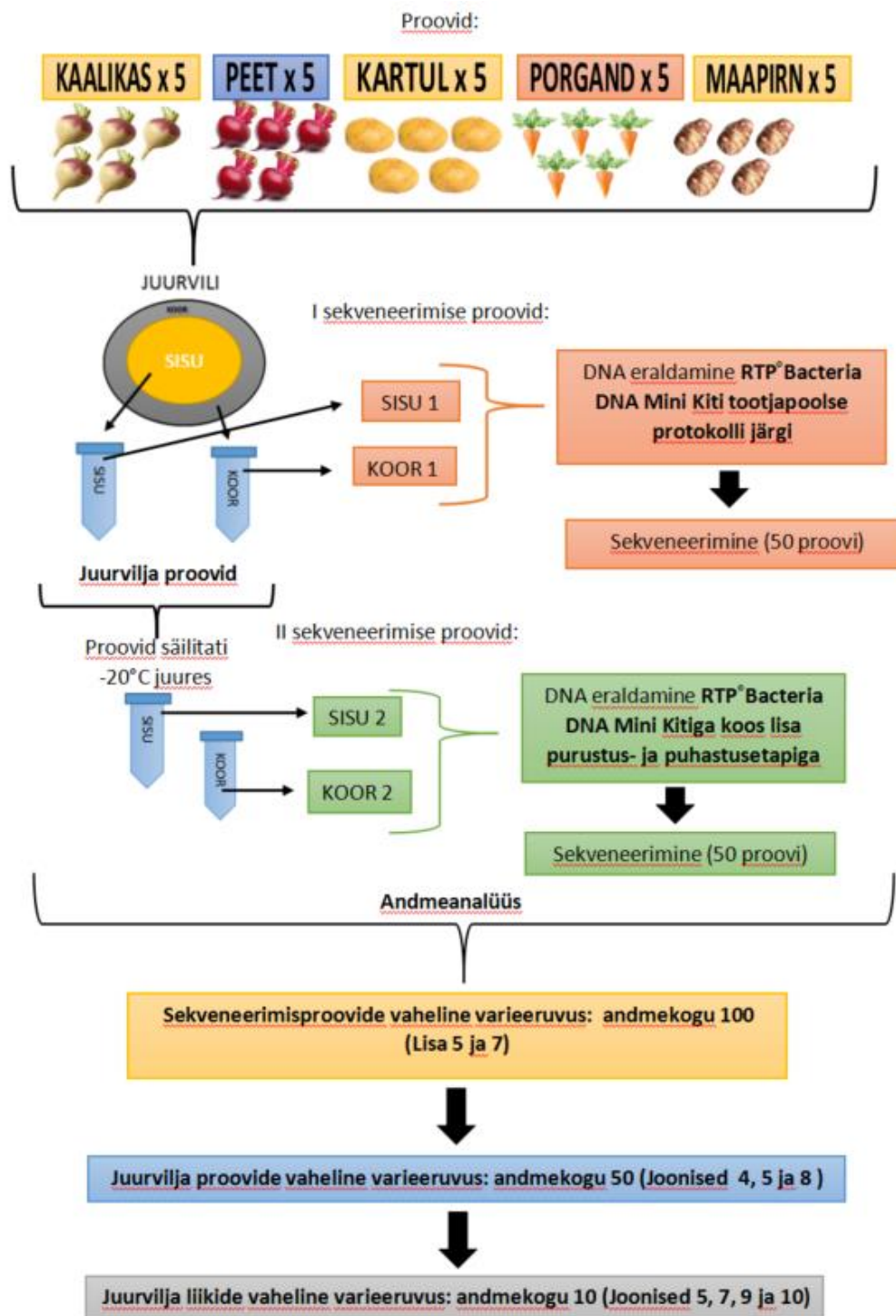
$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log_b p_i$$

Kus p_i on liigi proportsioon ja S liikide arv. P_i (liigi proportsioon) leitakse liigi lugemite arvu jagamisel kogu proovis esinevate lugemite arvuga. P_i korrutatakse naturaallorgaritmiga p_i ja iga liigi kohta saadud $(p_i \times \ln p_i)$ -d liidetakse omavahel. Nii saadakse Shannon-Weaver indeks iga proovi kohta eraldi. Mida suurem on H' seda suurem on liikide mitmekesisus proovis. Samas, kuna indeks kasutab liikide proportsioone, siis proportsionaalselt domineerivad liigid langetavad indeksi väärtust. Shannon-Weaver indeks arvutati I ja II sekveneerimise proovidele, et hinnata DNA eraldamise meetodi mõju proovide mitmekesisusele. Lisaks arvutati indeks veel juurviljade isendite koortele ja sisudele, et vaadata liigi sisest bakteriaalse mitmekesisuse varieeruvust ning juurviljade koortele ja sisudele, et hinnata liikide vahelist endofüütsete bakterite mitmekesisust.

Korrelatsiooni analüüsi kasutati, et leida antagonistlikke ja sünergistikke suhteid juurviljade OTUde vahel. Selleks kasutati Friedmani ja Almi (2012) poolt väljatöötatud meetodit SparCC (*Sparse Correlation for Compositional data*). Kasutati moodsat statistilist meetodit korrelatsioonimaatriksi arvutamiseks, kuna antud andmete puhul, mis summeeruvad konstandiks (nt. 100%) klassikaline Pearsoni korrelatsiooni arvutamise meetod ebaõnnestub. Seega kasutasime SparCC R-i funktsiooni (SparCC funktsioon), et arvutada juurviljas elavate bakterite OTUde korrelatiivsed seosed. Tulemuste illustreerimiseks kasutasime R paketi `corrgram` funktsiooni `corrgram()`.

2.3 Tulemused

Eestis laialdaselt kasvatatavate ja ka toorelt söödavate juurviljade bakteriaalse mikrobioomi uurimiseks võeti vaatluse alla viis fülogeneetiliselt kauget taime: kartul, kaalikas, peet, porgand ja maapirn. Selleks valiti välja igast liigist viis isendit, millest võeti eraldi koore ja sisu proov. Kõikidest proovidest eraldati DNA kahe erineva meetodiga: RTP[®]Bacteria DNA Mini Kiti tootjapoolse protokoll järgi ja sama protokoll koos lisatud purustus- ja puhastusetaipiga. Seejärel sekveneeriti proovid ja analüüsiti andmed (Joonis 3).



Joonis 3. Katseskeem. Igast juurvilja liigist uuriti 5 isendit. Kõikidest juurviljadest võeti eraldi koore ja sisu proovid (N=50). Igast proovist kasutati 1/2 kohe DNA eraldamiseks ning teine pool säilitati -20°C juures. Neist külmutatud proovidest (N=50) eraldati hiljem uuesti DNAd teise eraldamismeetodiga. Esimese ja teise DNA eraldamise produktid sekveneeriti eraldi, mille tulemusel saadi andmekogu 100. Seejärel andmed normaliseeriti ning erineva DNA eraldamisega saadud proovide lugemid summeeriti kahe kaupa, mille tulemusel saadi andmekogu 50. Viimaks summeeriti andmekogust 50 viie kaupa kõik ühe juurvilja liigi koore ja sisu lugemid, mille tulemusena saadi andmekogu 10, mis sisaldab viie koore ja viie sisu normaliseeritud lugemite summasid.

2.3.1 Sekvenerimisandmete kvaliteet

Viie juurvilja liigi proovide (50 sisu ja 50 koore proovi) kahel sekvenerimisanalüüsil saadi 7 828 340 lugemist (Tabel 2, Lisa 1). Järjestused klasterdati >97% järjestuse sarnasuse alusel 871 OTUks. Kahe sekvenerimise tulemuste kvaliteet oli väga erinev (Lisa 2, Lisa 3). RTP[®]Bacteria DNA Mini Kiti tootjapoolse protokoll järgi eraldatud proovidest saadi 12,5 korda vähem sekventse kui lisapuhastusega eraldatud meetodiga. OTUde arvus see erinevus paraku ei kajastunud (Tabel 2). Lisaks kuulusid 78% esimese sekvenerimise lugemitest kloroplastidele ja mitokondritele, samas kui teises sekvenerimises oli see vaid 3%. Peale mitokondrite ja kloroplastide järjestuste eemaldamist saadi kokku 7 134 756 sekventsi, mis klasterdati 816 OTUks ja määrati 19sse hõimkonda. Bakteritele kuulus 7 133 927 sekventsi, mis määrati 803 OTUks.

Tabel 2. Sekvenerimisandmete jaotus

	I sekvenerimine	II sekvenerimine	Kokku
Sekventside arv	578 498	7 249 842	7 828 340
OTUde arv	758	655	871
Keskmine sekventside arv proovi kohta	11 570	144 997	156 567
Keskmine OTUde arv proovi kohta	108	81	167
Kloroplastide sekventsid (% sekventside arvust)	107 865 (18,65%)	209 (0,002%)	108 074 (1,38%)
Kloroplastide OTUd (% OTUde arvust)	11 (1,45%)	4 (0,61%)	13 (1,5%)
Mitokondrite sekventside arv (% sekventside arvust)	344 181 (59,50%)	241 329 (3,3%)	585 510 (7,48%)
Mitokondrite OTUde (% OTUde arvust)	38 (5,01%)	15 (2,29%)	42 (4,82%)
Sekventside arv peale kloroplastide ja mitokondrite eemaldamist (% sekventside arvust)	126 452 (21,85%)	7 008 304 (96,67%)	7 134 756 (91,14%)
OTUde arv peale kloroplastide ja mitokondrite OTUde eemaldamist (% OTUde arvust)	709 (93%)	636 (96,64%)	816 (93,68%)
Arhede sekventside arv (% sekventside arvust)	24 (0,004%)	805 (0,009%)	829 (0,01%)
Arhede OTUde arv (% OTUde arvust)	8 (1,06%)	13 (1,98%)	13 (1,49%)
Bakterite sekventside arv (% sekventside arvust)	126 428 (21,85%)	7 007 499 (96,66%)	7 133 927 (91,13%)
Bakterite OTUde arv (% OTUde arvust)	701 (92,48%)	623 (95,11%)	803 (92,19%)

Enne andmete normaliseerimist eemaldati sekvenerimise tulemustest OTUd, millel oli vähem kui 20 lugemist. Peale seda jäi alles 247 OTUt, mis määrati 11 hõimkonda, milleks olid *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Cloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*,

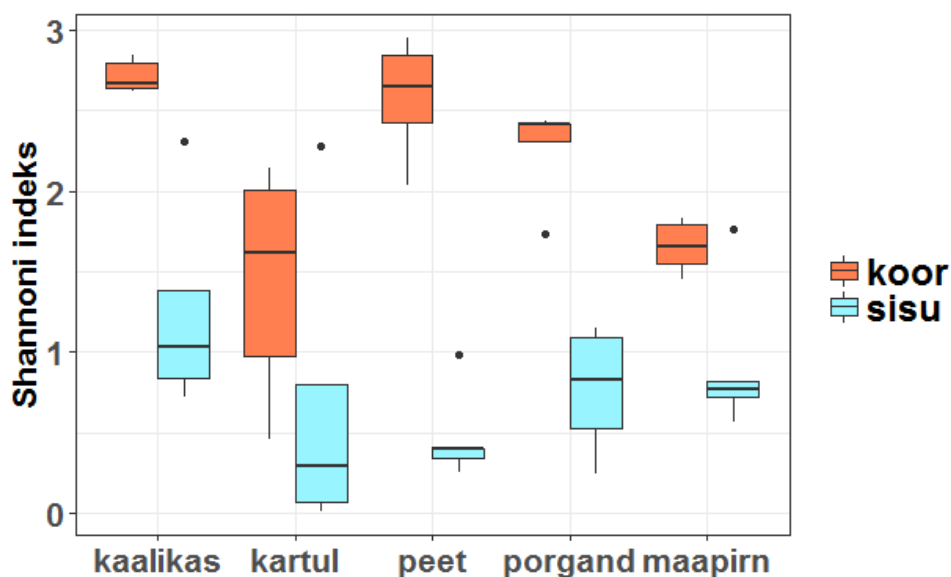
Firmicutes, *Proteobacteria*, *Saccharibacteria*, *Tenericutes*, *Thaumarchaeota* ja *Verruimicrobia*.

2.3.2 Suhteline mitmekesisus

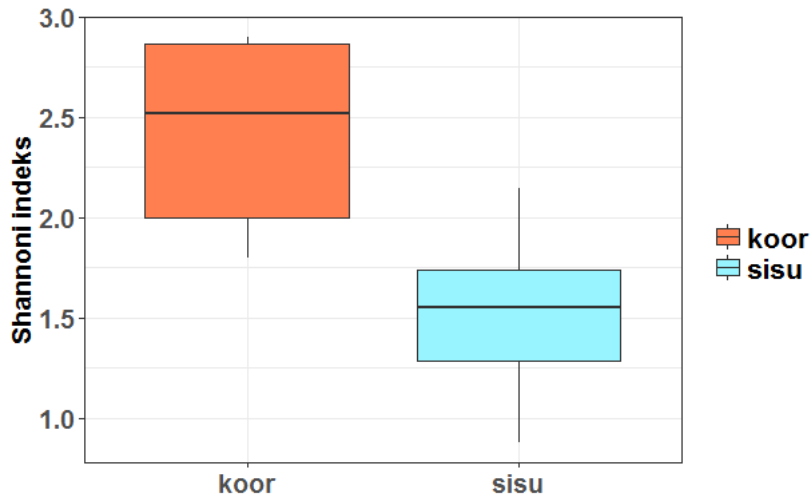
Bakterite suhtelise mitmekesisuse hindamiseks juurviljade kooses ja sisus kasutati Shannon-Weaver indeksit (vt. 2.2.5). Shannon-Weaver indeks arvutati kolmele andmekogule (Joonis 3).

I ja II sekveneerimise proovide Shannon-Weaver indeksid erinesid omavahel selgelt (Lisa 4), mis näitab, et erinevate DNA eraldamismeetoditega saadakse kätte erinev osa proovides olevast mitmekesisusest. Mitmetel I sekveneerimise proovidel on Shannon-Weaver indeks null, mis tuleneb vähestest sekventsides arvust nendes proovides (Lisa 4, Lisa 2). Siiski oli palju I sekveneerimise proove, mille Shannon-Weaver indeksid jäid 2 ja 4,5 vahele (Lisa 4). II sekveneerimise proovides jäid enamus indekseid 0 ja 1 vahele (Lisa 4).

Bakterite suhtelised mitmekesisused on juurviljade koortes ja sisudes selgelt erinevad (Joonis 4, Lisa 5). Juurvilja koortes on suurem bakterite suhteline mitmekesisus kui sisudes (Joonis 4), mis tuleb välja ka summeeritud juurviljade tasemel (Joonis 5). Kõige suurem bakterite suhteline mitmekesisus on kaalika kooses ning kõige väiksema mitmekesisusega koor on maapirn (Lisa 6). Juurvilja sisude mitmekesisused jäid 0,88 (peedi sisu) ja 2,14 (kartuli sisu) vahele (Lisa 6).



Joonis 4. Shannon-Weaver indeksite jaotus viie erineva juurvilja kooses ja sisus. Kasutati andmekogu 50.

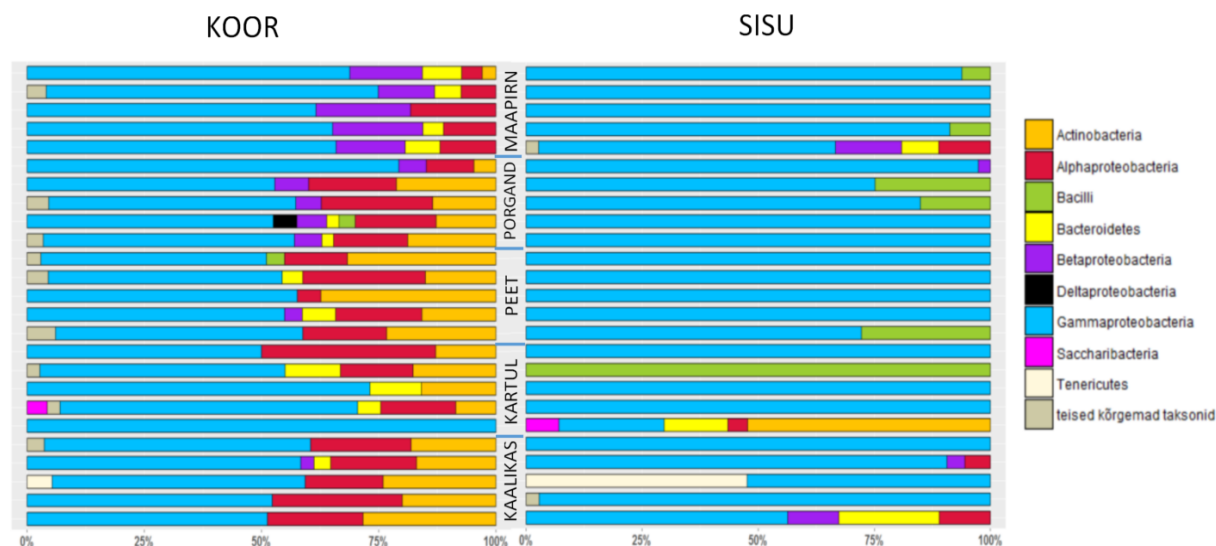


Joonis 5. Shannon-Weaver indeksi jaotused juurviljade koores ja sisus. Kasutati andmekogu 10.

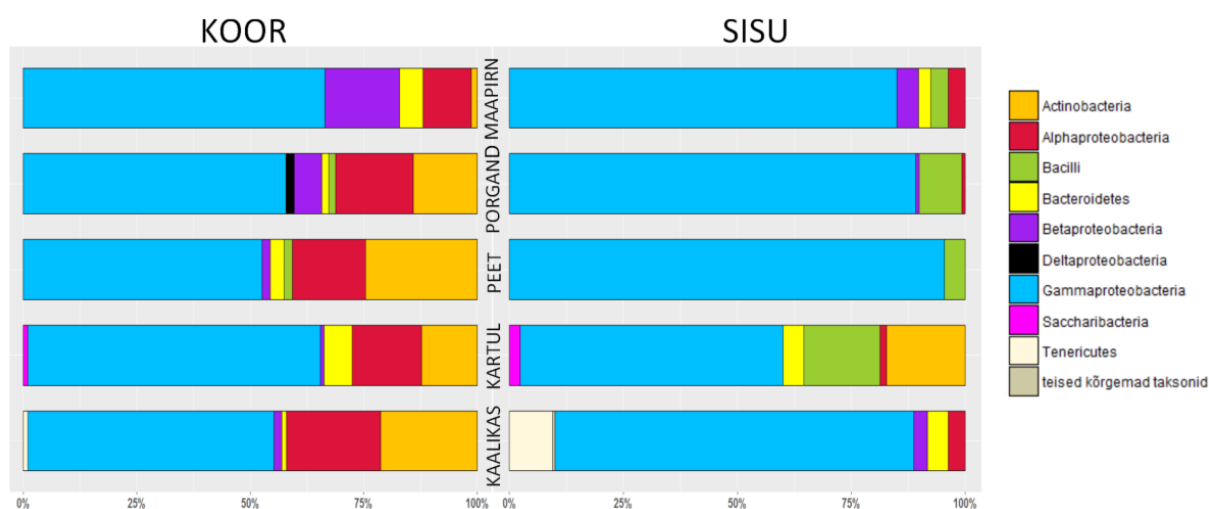
2.3.3 Bakteriaalne mitmekesisus

Juurviljades elavate bakterite suhtelist mitmekesisust hinnati hõimkondade ja olulisemate OTUde tasemel. Suhtelise mitmekesisuse aluseks võeti proovides esinevate OTUde arvukus ja nende kuuluvus hõimkonda või klassi. Kuna *Proteobacteria* ja *Firmicutes* on arvukad hõimkonnad, kuhu kuuluvad väga erinevate omadustega bakterid, siis vaadeldi neid OTUsid klasside (*Proteobacteria: Alpha-, Beta-, Delta- ja Gammaproteobacteria; Firmicutes: Bacilli ja Clostridia*) tasemel. Edaspidi käsitleti neid klasse ja teisi hõimkondi kui kõrgemat taksonit. Juurviljade kõrgemate taksonite mitmekesisuse kirjeldamisel kasutati 1% piirmäära (Joonised 6 ja 7). Kõrgemaid taksonid, mis ületas 1% piiri on 9 (*Actiobacteria, Alphaproteobacteria, Bacilli, Bacteroidetes, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Saccharibacteria, Tenericutes*). Alla 1% moodustavad taksonite protsendid liideti kokku ja lisati diagrammidele „teised kõrgemad taksonid“ nime all, kui nad ületasid 1% piirmäära (Joonised 6 ja 7).

Liigilise koosseisu visualiseerimiseks kasutati OTUde puhul 2% piirmäära, et diagrammidel oleksid OTUd eristatavad (Joonis 8 ja 9). Ka siin liideti väiksema protsendiga OTUd kokku ja lisati diagrammidele „teised OTUd“ nime all, kui nad kokku moodustasid >2% sekventsist. Juurviljade proovides on selliseid OTUsid 26 ja juurviljade osades 46, mis näitab, et väga paljud OTUd elavad juurviljades väikeste populatsioonidena.



Joonis 6. Bakterite hõimkondade/klasside suhteline mitmekesisus 1%-lise piirmääraga juurviljade sisu ja koore proovides. Andmekogu 50.



Joonis 7. Bakterite hõimkondade/klasside suhteline mitmekesisus 1%-lise piirmääraga erinevate juurviljaliikide sisus ja koores. Andmekogu 10.

Kõikide juurviljade koores ja sisus domineerisid *Gammaproteobacteria* esindajad (Joonis 6 ja 7) nagu *Enterobacteriaceae* ja *Pseudomonas* liigid (Joonis 8 ja 9). Juurviljades domineeriva OTU1 määras Silva 123 andmebaas (SILVA andmebaas) *Yersinia* perekonda. See määratlus on ebatõenäoline, sest kui võrrelda *Enterobacteriaceae* liikidel sekveneerimiseks kasutatud V4 regiooni järjestusi, siis see piirkond on nende liikide vahel väga sarnane (> 97%). Sellest tulenevalt on sellesse sugukonda kuuluvaid liike sekveneeritud regiooni põhjal üksteisest raske eristada. Seega OTU1te ei ole võimalik V4 regiooni alusel määrata täpsemalt kui sugukonna tasemel ja tõenäoliselt kuulub siia mitu erinevat *Enterobacteriaceae* liiki.

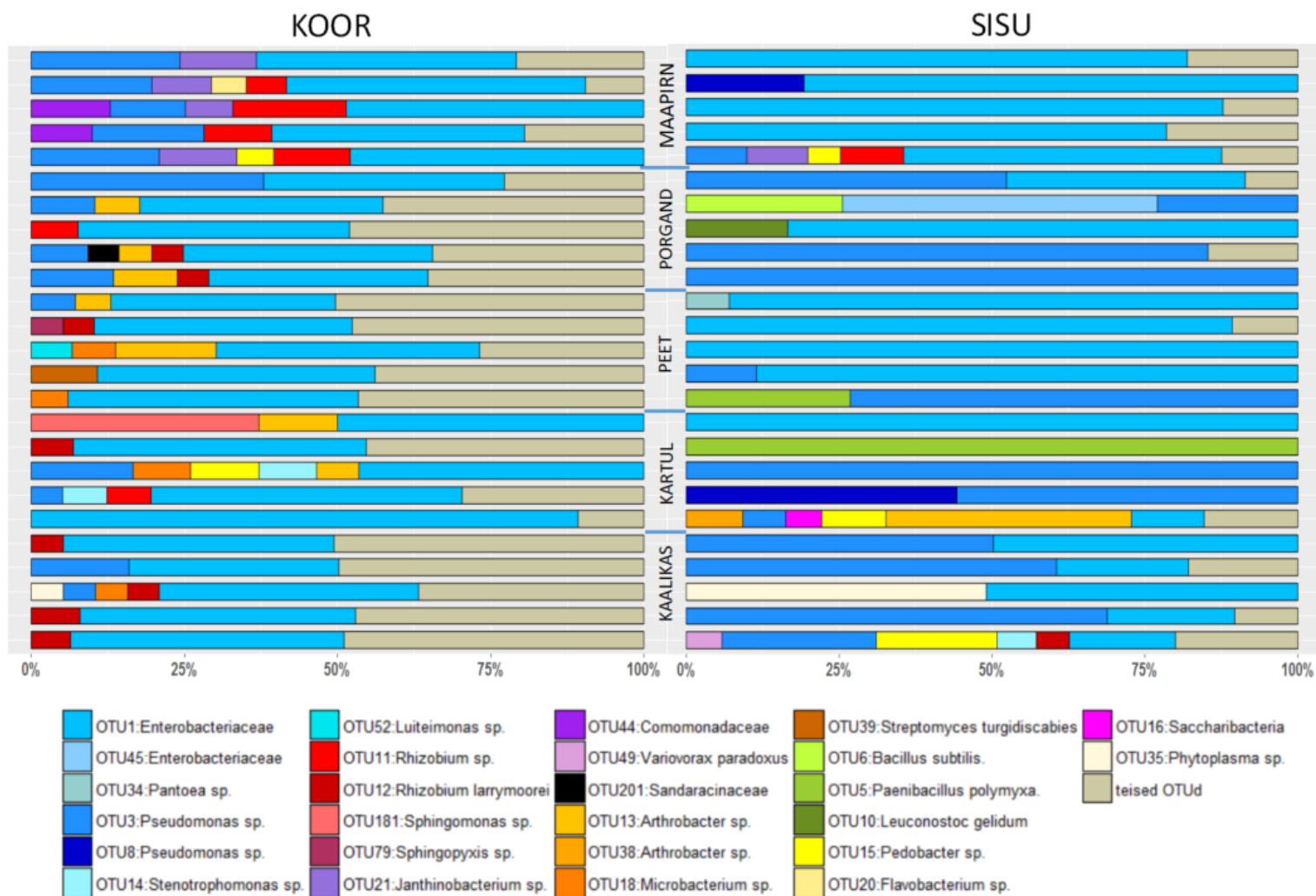
Teine OTU, mis esines kõikides juurvilja osades on OTU3, mille Silva andmebaas määras *Pseudomonase* perekonda (Joonis 9).

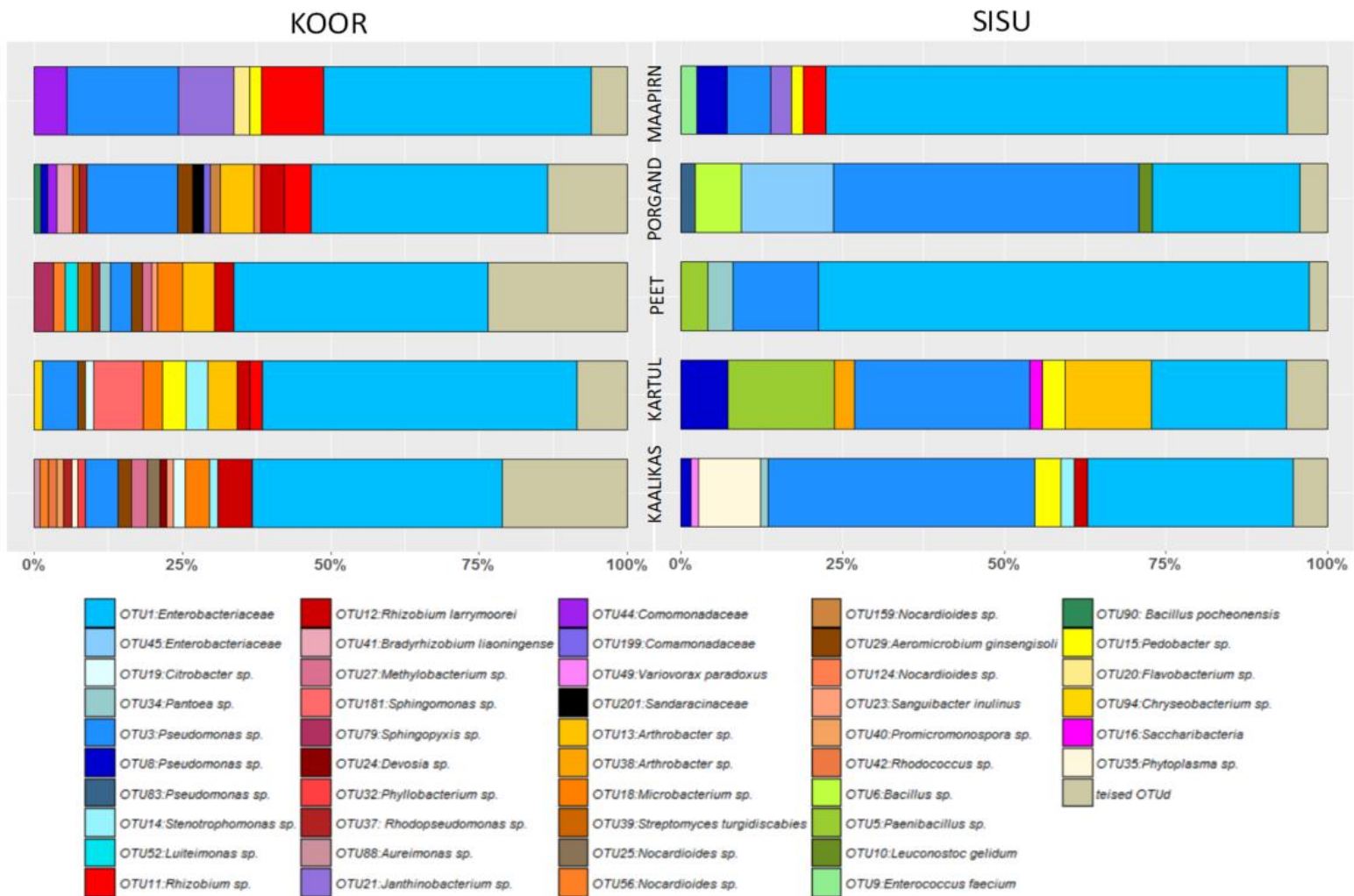
Mõned bakteri klassid/hõimkonnad esinevad suurema tõenäosusega kooses, teised sisus. Kooses on sellisteks taksoniteks *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* ja *Bacteroidetes* (Joonis 6 ja 7). Kõikides juurvilja koortes on palju *Alphaproteobacteria* OTUsid, nende mitmekesisus on suur, igat üksikut OTUt on aga enamasti alla 2%, seetõttu on domineerivate OTUde joonisel 9 nende hulk väike. Kartuli, kaalika, peedi ja porgandi kooses on iseloomulikud *Actinobacteria* esindajad. Maapirni kooses on nende huk märgatavalt väiksem. Maapirni koort iseloomustab klass *Betaproteobacteriat* esindavad OTUd (OTU21 määrati *Janthinobacteriumi* perekonda ja OTU44 *Comamonadaceae* sugukonda). *Betaproteobacteria* esindavaid OTUsid on ka porgandi koore proovides, kuid selgelt väiksemas proportsioonis. Hõimkond *Bacteroidetes* esindajad on enamasti kõikide juurviljade koortes, kuid võtavad enda alla tunduvalt väiksema osa mikroobioomist kui aktinobakterid ja alfa proteobakterid (Joonis 6 ja 7).

Kõikide eelpoolnimetatud koorele iseloomulike hõimkondade/klasside esindajaid leidub ka juurviljade sisus, kuid juhuslikult üksikutes proovides ja väiksemas proportsioonis.

Juurviljade sees on lisaks gammaproteobakteritele rohkem *Bacilli* esindajaid (Joonis 7). Koortest esineb *Bacilli* liike ainult porgandis ja peedis, kuid tunduvalt vähem kui nende sisus (Joonis 7). Näiteks, *Paenibacillus polymyxa* (OTU5) on ühe kartuli sisus ainukene OTU (Joonis 8). Maapirni sisus esineb OTU9, mis määrati *Enterococcus faeciumiks*, mille populatsioon maapirni sisudes on väike, kuid proovide summeerides tuleb ta arvkus esile.

Lisaks esines üksikutes proovides märkimisväärsel hulgal kolm OTUt (OTU35, OTU16, OTU201), mis kuulusid *Tenericutese*, *Saccharibacteria* ja *Deltaproteobacteria* taksonitesse (Joonis 6, 7, 8 ja 9). Nende OTUde puhul ei ole võimalik kindlalt öelda kas nad kuuluvad antud juurvilja bakterite mikroobioomi või on nad sattunud antud juurviljadesse juhuslikult. Selle jaoks on meie juurviljade isendite valim liiga väike.





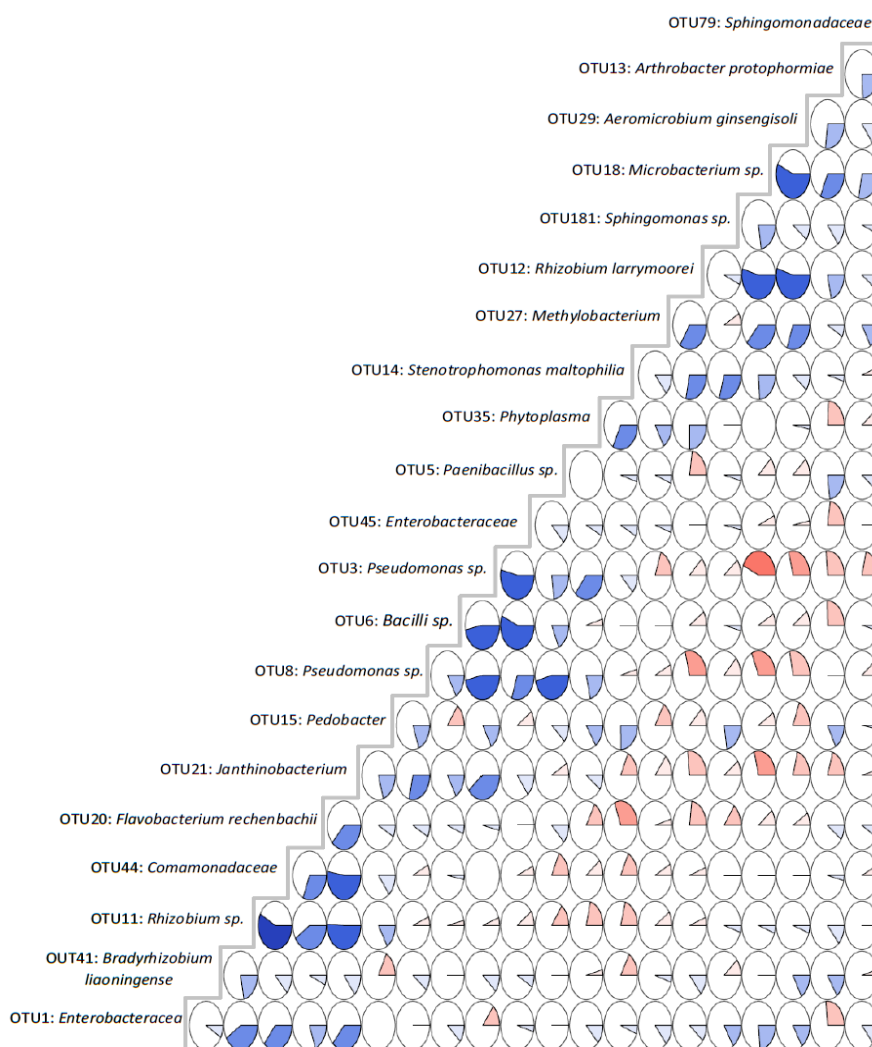
Joonis 9. Bakterite liigiline koosseis 2%-lise piirmääraga erinevate juurviljaliikide kooses ja sisus. Andmekogu 10. Sinised toonid: *Gammaproteobacteria*; punased toonid: *Alphaproteobacteria*; lillad toonid: *Betaproteobacteria*; must: *Deltaproteobacteria*; oranžid-pruunid toonid: *Actinobacteria*; rohelised toonid: *Bacilli*; kollased tooni: *Bacteroidetes*; erkroosa: *Saccharibacteria*; valge: *Tenericutes*, hallikas: teised OTUd.

2.3.4 OTUde vahelised seosed juurviljade koortes ja sisudes

On võimalik, et mõnel mikroobil on omavahel positiivsed või negatiivsed seosed. Selle uurimiseks kasutati SparCC korrelatsiooni maatriksit (Joonis 10).

Tulemused näitasid, et juurviljade sisudes domineerivatel OTUd (OTU6, OTU5, OTU45, OTU3 ja OTU8), mis kuuluvad *Gammaproteobacteria* ja *Bacilli* klassidesse on omavahel positiivne korrelatsiooni. Positiivseid korrelatsioone on omavahel ka *Actinobacteria* ja *Alphaproteobacteria* OTUdel (OTU12, OTU79, OTU181, OTU13, OTU18, OTU29), mis esinesid juurviljade koortes.

Negatiivseid korrelatsioone oli juurviljade OTUde vahel vähem. *Pseudomonase* perekonna OTUdel (OTU3 ja OTU8) olid antagonistlikud suhted *Alphaproteobacteria* ja *Actinobacteria* taksonitesse kuuluvate OTUdega (OTU79, OTU 29, OTU18, OTU181, OTU12, OTU27).



Joonis 10. OTUde SparCC korrelatsiooni maatriksi visualiseering juurviljade sisu ja koore tasemel. Andmekogu 10. Skaala varieerub sinisest punaseni, mida intensiivsem sinine, seda positiivsem korrelatsioon ja mida intensiivsem punane seda negatiivsem korrelatsioon.

2.4 Arutelu

Tänapäeva inimeste liiga puhas elukeskkond ja toit on vähendanud inimeste soolestiku mikrobioomi mitmekesisust ning toonud kaasa mitmete soole mikrobioomi tasakaaluga seotud haiguste esinemise kasvu. Seda on täheldatud eelkõige arenenud maades, kus elatakse linnakeskkonnas, on kõrged nõuded isiklikule hügieenile ning toit on enamasti töödeldud (Graham-Rowe, 2011). Häireid inimese soole mikrobioomi tasakaalus seostatakse allergiate, autoimmuunhaiguste, pärasoole vähi, erinevate metaboolsete haiguste ja bakteriaalsete infektsioonidega (Prakash jt., 2011). Palju on uuritud keskkonna mõju inimese mikrobioomile (Bowers jt., 2013; Johnson jt., 2013; Hsieh jt., 2014; Mena jt., 2015), kuid vähem on tähelepanu pööratud toiduga seotud mikroorganismide mõjule soole mikrobioomile (Lang jt., 2014). Taimed moodustavad olulise osa inimeste toidulauast ja neil on väga mitmekesine mikrobioom. Kõige rohkem mikroobe leidub taimede juurtes (Chi jt., 2005). Sellest tulenevalt peaksid juurviljad olema inimestele oluline kokkupuutepunkt bakteritega.

Antud töös kirjeldati viie juurvilja endofüütsete bakterite kooslusi koostis ja sisu. Selleks kasutati kahte erinevat DNA eraldamise meetodit ja 16S rDNA V4 regiooni PCR produktide sekveneerimist Illumina MiSeq tehnoloogiaga. Töö eesmärk oli testida erinevaid DNA eraldamistehnikaid ning kirjeldada juurviljade endofüütseid bakterite kooslusi. Sekveneerimisandmete analüüsil detekteeriti juurviljade koortes ja sisus baktereid, kes kuulusid 11 hõimkonda, milleks olid *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Cloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Saccharibacteria*, *Tenericutes*, *Thaumarchaeota* ja *Verrumicrobia*. See on sarnane teiste kartuli (Garbeva jt., 2001; Sessitsch jt., 2002; Kõiv jt., 2015) ja porgandi (Nithya ja Babu, 2017) uuringute tulemustega, kus domineerivad *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetese* ja *Firmicutese* hõimkonna bakterid.

Kõikide juurviljade koortes oli mitmekesisus suurem, kui sisudes. See ei ole üllatav, sest juured omastavad enda mikrobioomi neid ümbritsevast risosfäärist. Mitmed mikrobioomi omastamise mudelid on näidanud, et juure mikrobioomi mitmekesisus väheneb väljastpoolt sissepoole, samal ajal suureneb endofüütsete bakterite spetsialiseeritus taimede koloniseerimisel (Reinhold-Hurek jt., 2015). Siiski ei saa välistada, et mõned endofüüdid on pärit seemnest või taime osadest, mida kasutatakse taimede paljundamiseks. Seemnest pärit endofüüdid on omakorda võimelised koloniseerima risosfääri (Johnston-Monje ja Raizada, 2011, Pereira jt., 2011). Sellest tulenevalt võiks arvata, et OTU3 *Pseudomonase sp.*, mida esines palju rohkem sisus kui koortes võib olla seemnest pärit endofüüt. Selle kindlakstegemiseks oleks, aga vaja eraldi uurimust.

Juurviljade koortes ja sisudes domineerisid *Gammaproteobacteria* liigid, kellest arvukamad kuulusid *Enterobacteriaceae* sugukonda ja *Pseudomonase* perekonda. Enterobacteriaceae sugukonda kuuluvad nii taime-kui inimese patogeenid ja kommensaalid.

Koortes oli rohkem *Alphaproteobacteria* ja *Actinobacteria* liike, kes on tuntud mulla ja risosfääri bakterid (Ofek-Lalzar jt., 2014). *Actinobacteria* liike leidub ka inimese soole mikrobioomis, kus tuntumateks bifidobakterid, mida on taimedes siiski väga vähe.

Betaproteobacteria liigid olid esindatud maapirnis ja porgandis, mille koor on võrreldes teiste uuritud juurviljadega natukene õhem ja võimalik, et sellest tulenevalt nendele bakteritele paremini koloniseeritav. *Betaproteobacteria* liike leiti olulisel määral ka Indias kasvatatud porganditel (Nithya ja Babu, 2017). Kuid maapirni koore eripära, kus oli palju *Betaproteobacteria* esindajaid võis mõjutada erinev kasvukoht (mullatüüp) ja saagikoristus aeg kui teistel uuritud juurviljadel.

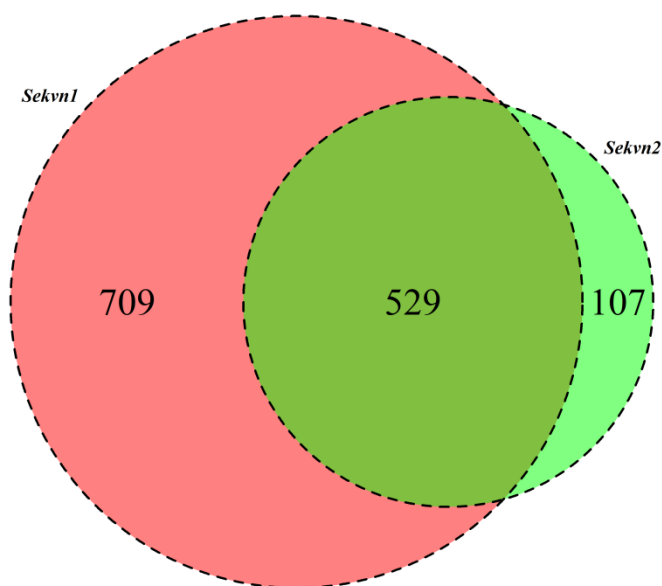
Fermenteeritud toidu mõju inimeste mikrobioomile on palju uuritud ja leitud, et tegemist on olulise probiootikumide allikaga (Selhub jt., 2014; Kamiya jt., 2016; Kong jt., 2016; He jt., 2017; Liu jt., 2017; Marco jt., 2017). Maapirni sisus leidis *Enterococcus faecium*-ile vastav OTU9. *E. faecium* kuulub toitu fermenteerivate nn. piimhappe-bakterite hulka. Võimalik, et selles juurviljas oligi alanud fermenteerimisprotsess. *E. faecium* on tuntud ka inimese peensoole kommensaalina.

Toortoiduga seotud bakterite mõju inimeste soole mikrobioomile on vähe uuritud valdkond (Leff ja Fierer, 2013; Lang jt., 2014). Juurviljade söömisel koorega puutub seedimiselundkond kokku suurema mikroobse mitmekesisusega, kui kooritud juurviljade puhul. Toorete kooritud juurviljade söömine on kasulik meie soolestiku mikrobioomile mitte ainult juurviljades leiduvate prebiootiliste, nn seedimatute ainete poolest, vaid seal elavate bakterite poolest, kes võivad aidata arendada meie immunsüsteemi (Round ja Mazmanian, 2009; Kamiya jt., 2016; Thaiss jt., 2016). Viimasel ajal on siiski hakanud ilmuma uurimusi, kus näidatakse keskkonnabakterite mõju inimese immuunsüsteemile (Chatterjee jt., 2016). Seejuures on näidatud, et gram-negatiivsete bakterite (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*) lipopolüsahhariidid kaitsevad allergiate eest (Schuijs jt., 2015). Käesolevas töös uuritud juurviljades oli palju *Pseudomonase* perekonna ja *Enterobacteriaceae* sugukonna esindajaid.

Teise olulise rühmana võiks nimetada spoore moodustavaid selts *Bacillales* esindajaid, mida leidis nii koores kui ka sisus. Üheltpoolt taimekaitses olulised *Paenibacillid* (*Paenibacillus polymyxa* kartulis) ja teisest küljest nt. *Bacillus subtilis*, kui potentsiaalne probiootikum inimese eluea pikendajana (Ayala jt., 2017). Spoore moodustavatel batsillidel on suurem

võimalus imetajate seedekulglasse pääseda ja on seetõttu ka juba ammu tuntud koduloomade probiootikumidena (Hong jt., 2005).

Erinevat liiki juurikate andmete ühendamine andis olulist teavet koore mikrobioomi *Alphaproteobacteria* ja *Actinobacteria* OTUde kohta. Nimelt nende OTUde arv, mida oli rohkem kui 2% proovist oli isendite puhul väiksem kui liigi tasemel (Joonis 8 ja 9). Sellest saab teha järelduse, et koores on palju erinevaid *Alphaproteobacteria* ja *Actinobacteria* liike, kes elavad seal väikeste populatsioonidena. Sellest tulenevalt on juurvilja liigi mikrobioomi kirjeldamiseks vaja piisavalt proove, et ühe proovi erisused ei tõuseks esile kogu mikrobioomis. Käesoleva töö andmed näitavad, et juurvilja isendite varieeruvus on suur ning ühes proovis domineeriv takson võib liiga väikese valimi korral anda kallutatud pildi taimeliigi mikrobioomis domineerivatest liikidest (Joonis 8 ja 9). Siiski saab meie andmetest järeldada, et *Saccharibacteria*, *Tenericutes* ja *Deltaproteobacteria* liigid on võimelised juurvilju koloniseerima. Taimeliigi mikrobioomi kirjeldamiseks on vaja aga rohkem proove. Mikroobse mitmekesisuse kirjeldamisel kultiveerimisest sõltumatute meetodite abil on DNA eraldamise etapp määrava tähtsusega (Yuan jt., 2012). Erinevad DNA eraldamismeetodid mõjutasid sekveneerimisel saadud sekventsides kvaliteeti ja hulka, kuid leitud OTUde arvud olid sarnased (Tabel 1). Suur osa leitud OTUdest esinesid mõlema sekveneerimise proovides, kuid siiski andis kumbki DNA eraldamisviis arvestatavas koguses unikaalseid OTUsid (Joonis 11).



Joonis 11. Esimese ja teise sekveneerimise OTUde arv. Sekvn1 vastab esimesele sekveneerimisele, Sekvn2 vastab teisele sekveneerimisele.

Seega oleks ainult ühe DNA eraldamisel tulemuste kasutamisel oluline osa leitud mitmekesisusest läinud kaduma. Sellest tulenevalt peaks proovidest eraldama DNAd, vähemalt kahe erineva meetodiga, mis oleksid suunatud erinevat tüüpi mitmekesisuse kätte saamisele. Kõige suurem tehniline probleem meie töös oli, et esimesel sekveneerimisel saadi väga palju mitokondri ja kloroplasti järjestusi ja vähe bakterite sekventse. Selle probleemi lahendamiseks on meil plaanis kasutada antud taimeliikide mitokondrite ja kloroplastide sekveneeritavale järjestusele vastavaid PNAsid (ing k *peptide nucleic acid*), mis seonduvad tugevalt amplifitseeritavale piirkonnale ega lase PCR produkte lõpuni sünteesida. Siiski ei lahenda see kogu probleemi, sest kahel sekveneerimisel saadi 42 mitokondrite ja 12 kloroplastide OTUt, kuigi meil oli ainult viis erinevat taimeliiki. Paljud mitokondri OTUd esinesid ka kõikides proovides (Lisas 8). See tekitab küsimuse nende teiste OTUde päritolu kohta. Võimaluste ring sisaldab endas vigu või puudusi sekveneerimisel, OTUde kokku panemisel 97% järjestuste sarnasuse alusel ja andmebaasi järjestustes. Üks võimalus on, et osa mitokondriks/kloroplastiks määratud OTUd võivad kuuluda hoopis bakteritele, mille järjestused on antud mitokondrite ja kloroplastide järjestustega väga sarnased. Sellisel juhul jääb see osa bakterite mitmekesisusest meil kirjeldamata. Kasutades kahte erinevat DNA eraldamismeetodit on majanduslikult mõistlik edaspidi peale PCR amplifikatsiooni proovid kokku panna ja sekveneerida ühe proovina.

Meie töö tulemused näitavad, et juurviljades on bakteriaalne mitmekesisus suur ja varieeruv ning võib mõjutada inimese soole mikrobioomi tasakaalu. Selleks tuleks, aga uurida veel kasvatamis- ja säilitamistingimuste mõju juurviljade mikrobioomile ning lõpuks ka teha kontrollitud toitumiskatseid inimestega.

Kokkuvõte

Käesolevas töös uuriti endofüütsete bakterite kooslusi viiel Eestis kasvatataval juurvilja liigi (kaalikas, kartul, peet, porgand, maapirn) sisus ja kooses. Selleks kasutati kahte erinevat bakteriaalse DNA eraldamismeetodid: RTP[®]Bacteria DNA Mini Kiti tootjapoolse protokoll järgi ja sama protokoll järgi koos lisatud purustus-ja puhastusetapiga. Bakterite identifitseerimiseks amplifitseeriti PCR 16S rDNA V4 hüpervariaabel regiooni, mis sekveneeriti Illumina MiSeq tehnoloogiaga.

Kahe sekveneerimise tulemused oli väga erinevad saadud sekventsides arvu ja kvaliteedi poolest, kuid see ei kajastunud leitud OTUde arvus. Leitud OTUd kuulusid 11 hõimkonda: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Cloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Saccharibacteria*, *Tenericutes*, *Thaumarchaeota* ja *Verrumicrobia*. Juurviljade kooses kui sisus domineerisid *Gammaproteobacteria* liigid. Kõikide juurviljade kooses oli *Alphaproteobacteria* esindajaid. Kartuli, kaalika, peedi ja porgandi kooses on iseloomulikud *Actinobacteria* esindajad. Maapirni koort, aga iseloomustavad *Betaproteobacteria* liigid. *Bacteroidetese* esindajad oli vähesel hulgal kõikide juurviljade kooses. Juurviljade sees oli lisaks gammaproteobakteritele olulisel hulgal *Bacilli* esindajaid.

Juurviljade sees on väga mitmekesine endofüütsete bakterite kooslus, millega inimesed neid süües igapäevaselt kokku puutuvad. Käesolev uurimus on pelgalt esimene samm kirjeldamiseks juurviljade endofüütset mikrobioomi ja selle võimalikku mõju inimese mikrobioomile. Laiaulatuslike järelduste tegemiseks on oluline uurimistööd jätkata.

Endophytic bacteria in root vegetables cultivated in Estonia.

Krõõt Arbo

SUMMARY

Diverse assemblages of microbes colonize plant roots and collectively function as microbiome. There are various reports about agriculturally important plants root microbiomes, but very few about vegetables. Swedish physician Agnes Wold proposed gut deprivation hypothesis, what included “low exposure to bacteria via food or the environment in general. All this results in an „abnormally“ stable microflora” in Westernized nations (Wold, 1998). Disruption of the intestinal ecosystem equilibrium is associated with human diseases, including autoimmune and allergic diseases, colorectal cancer, metabolic diseases, and bacterial infections (Prakash jt., 2011). Vegetables like turnip, potato, beet root, carrot and Jerusalem artichoke are important parts of our diet. They are exposed to the diverse rhizosphere microbiota, which should make them important source of microbes for humans.

Here we describe the endophyte bacteria microbiomes of five vegetables (turnip, potato, beet root, carrot, Jerusalem artichoke) peel and inner content cultivated in Estonia. We applied two different DNA extraction methods and used PCR amplicon of 16S rDNA (V4 region) with the Illumina MiSeq technology.

Data quality from two different DNA extraction methods samples differed substantially in sequence numbers and quality. Surprisingly it did not affect OTUs numbers from different extractions. The analyses revealed more diverse bacterial assemblages in vegetables’ peel than in their inner content. There were bacteria from 11 phylum: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Cloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Saccharibacteria*, *Tenericutes*, *Thaumarchaeota* ja *Verrumicrobia*. *Gammaproteobacteria* was the most dominant lineage in both peel and content. In peel there was a diverse *Alphaproteobacteria* population in every vegetable. In turnip, potato, beet root and carrot peel was a diverse *Actinobacteria* population. In Jerusalem Artichokes’ peel were considerable amounts of *Betaproteobacteria*. In the inner content there were also representatives of *Bacilli*. Our study showed that there are diverse bacterial microbiomes in vegetable peels and kinner contents. It is important to continue research on these microbiome and on their interaction with human microbiome.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajaid Viiat ja Ülot juhendamise, abivalmiduse ja õpetamise eest. Tänan ka kogu Tehnoloogiainstituudi kollektiivi sõbraliku ja abivalmi töökeskkonna tekitamise eest.

Kasutatud kirjandus

Kasutatud artiklid

Andreote, F. D., Da Rocha, U. N., Araújo, W. L., Azevedo, J. L., van Overbeek, L. S. (2010). Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek*, 97: 389-399.

Azevedo, J. L., Maccheroni Jr, W., Pereira, J. O., de Araújo, W. L. (2000). Endophytic microorganism. *Journal of Biotechnology*, 3(1): 717-3458.

Ayala, F. R., Bauman, C., Cogliati, S., Leñini, C., Bartolini, M., Grau, R. (2017). Microbial flora, Probiotics, *Bacillus subtilis* and the search for a long and healthy human longevity. *Microbial Cell*, 4(4): 133-136.

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev Plant Biol*, 57: 233-66.

Balsanelli, E., Serrato, R. V., de Baura, V. A., Sasaki, G., Yates, M. G., Rigo, L. U., Pedrosa, F. O., de Souza, E. M., Monteiro, R. A. (2010). *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environ. Microbiol.*, 2010: 2233-2244.

Bashan, Y. (1986). Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 3407-3414.

Bashan, Y., Holguin, G. (1993). Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 379-385.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.*, 17: 478-86.

Berg, G., and Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1): 1-13.

- Bertin, C., Yang, X., Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil*, 256: 67-83.
- Bhore, S. J., Nithya, R., Loh, C. Y. (2010). Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of Sambung nyawa [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. *Bioinformation*, 5: 191-197.
- Blaser, M. J. & Kirschner, D. (2007). The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature* 449, 843–849.
- Bowers, R. M., Clements, N., Emerson, J. B., Wiedinmyer, C., Hannigan, M. P., Fierer, N. (2013). Seasonal variability in bacterial and fungal diversity of the near-surface atmosphere. *Environ Sci Technol*, 47:12097–106.
- Bulgari, D., Bozkurt, A. I., Casati, P. (2012). Endophytic bacterial community living in roots of healthy and ‘Candidatus phytoplasma mali’- infected apple (*Malus domestica*, Borkh.) trees. *A Van Leeuw.*, 102: 677-687.
- Canfora, E. E., Jocken, J. W., and Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), 577–591.
- Chanway, C. P. (1996). Endophytes: they’re not just fungi! *Can J Bot.* 74:321-322.
- Chatterjee, P., Davis, E., Yu, F.,...Wildschutte, H. (2016). Environmental Pseudomonads inhibit cystic fibrosis patient-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 30;83(2).
- Chi, F., Shen, S. H., Cheng, H. P., Jing, Y. X., Yanni, Y. G., Dazzo, F. B. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 7271-7278.
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., ... O’Toole, P. W. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 448: 178-184.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.*, 42: 669-78.

Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., Sessitsch A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: Identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol.*, 62: 188-197.

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clement, C., Ait Barka, E. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1685-1693.

Compant, S., Sessitsch, A., Mathieu, F. (2012). The 125th anniversary of the first postulation of the soil origin of endophytic bacteria - A tribute to M.L.V. Galippe. *Plant and Soil*, 356(1-2): 299-301.

Coombs, J. T., Franco, C. M. M. (2003). Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9): 5603-5608.

Costa, R., Salles, J. F., Berg, G., Smalla, K. (2006). Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants. *Environ. Microbiol.*, 8: 2136-49.

Costello, E. K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326: 1694-7.

Coutinho, B. G., Licastro, D., Mendonca-Previato, L., Camara, M., Venturi, V. (2015). Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 28: 10-21.

Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 443-459.

Curtis, T. P., Sloan, W. T., Scannell, J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 1049-9.

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., ... Turnbaugh, P. J. (2013). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484): 559-563.

De Boer, S. H., Copeman, R. J. (1974). Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot disease. *Can. J. Plant. Sci.*, 54: 115-122.

de Oliveira Costa, L. E., de Queiroz, M. V., Borges, A. C., de Moraes, C. A., de Araújo, E. F. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology* : [Publication of the Brazilian Society for Microbiology], 43(4): 1562-75.

Doornbos, R. F., van Loon, L. C., and Bakker, P. A. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. *Agron. Sustain. Dev.*, 32: 227-243.

Dörr, J., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B. (1998). Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol. Microbiol.*, 30: 7-17.

Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., ... Jeffery, L. D. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8): E911–E920.

Figueredo, M. S., Tonelli, M. L., Ibáñez, F., Morla, F., Cerioni, G., del Carmen Tordable, M., Fabra, A. (2017). Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. *Microbiological Research*, 197: 65-73.

Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P. & Louis, P. (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health: Minireview. *Environ. Microbiol.* 9, 1101–1111.

Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P. and Duncan S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 577- 589.

Fürnkranz, M., Lukesch, B., Müller, H., Huss, H., Grube, M., Berg, G. (2012). Microbial diversity inside pumpkins: Microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microb. Ecol.*, 63: 418-428.

Gangwar, M., Kaur, G. (2009). Isolation and characterization of endophytic bacteria from endorhizosphere of sugarcane and ryegrass. *Internet J. Microbiol.*, 7: 139-144.

Garbeva, P., Van Overbeek, L. S., van Vuurde, J. W. L., Van Elsas, J. D., Overbeek, L. S., Vuurde, J. W. L., and Elsas, J. D. (2001). Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial Ecology*, 41(4): 369-383.

Gottel, N. R., Castro, H. F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D. A., Podar, M., ... Schadt, C. W. (2011). Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17): 5934-5944.

Graf, D., Di Cagno, R., Fåk, F., Flint, H. J., Nyman, M., Saarela, M., and Watzl, B. (2015). Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26164.

Graham-Rowe, D. (2011). Lifestyle: When allergies go west. *Nature*, 479(7374), S2–S4.

Hacquard, S., Garrido-Oter, R., Gonzalez, A.,...Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host and Microbe*, 17(5), 603–616.

Haichar, F. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J.*, 2: 1221-30.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10): 895-914.

Hardoim, P. R., Andreote, F. D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L. S., van Elsas, J. D. (2011). Rice root-associated bacteria: Insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 77: 154-64.

Hardoim, P. R., Overbeek, L. S., van Berg, G., Maria, A. (2015). The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 79(3): 293-320.

He, G., Liu, T., Sadiq, F. A., Gu, J., and Zhang, G. (2017). Insights into the microbial diversity and community dynamics of Chinese traditional fermented foods from using high-throughput sequencing approaches. *J Zhejiang Univ Sci B*, 18(4): 289–302.

Hong, H. A., Duc le H., Cutting, S.M. (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 29 (4): 813-835.

Hsieh, S, Klassen, A. C., Curriero, F. C., Caulfield, L. E., Cheskin, L. J., Davis, J. N., Goran, M. I., Wigensberg, M. J., and Spruijt-Metz, D. (2014) Fast-food restaurants, park access, and insulin resistance among Hispanic youth. *Am J Prev Med*, 46:378–87.

Huang, J.-S. (1986). Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24: 141-157.

Huse, S. M., Ye, Y. Z., Zhou, Y. J., Fodor, A. A. (2012). A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS ONE*, 7: e34242.

Jacobs, M., Bugbee, W. M., Gabrielson, D. A. (1985). Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Can. J. Bot.*, 63: 1262-1265.

James, E. K., Olivares, F. L. (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17: 77-119.

Johnson, K. B., Jacob, A., Brown, M. E. (2013). Forest cover associated with improved child health and nutrition: evidence from the Malawi Demographic and Health Survey and satellite data. *Glob Health Sci Pract*, 1:237–48.

- Johnston-Monje, D., Raizada, M. N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS One* 6:e20396.
- Kabeerdoss, J., Shobana Devi, R., Regina Mary, R., and Ramakrishna, B. S. (2012). Faecal microbiota composition in vegetarians: comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. *British Journal of Nutrition*, 108(06), 953–957.
- Kamiya, T., Watanabe, Y., Makino, S., Kano, H., and Tsuji, N. (2016). Improvement of Intestinal Immune Cell Function by Lactic Acid Bacteria for Dairy Products. *Microorganisms*, 5(1), 1.
- Kloepper, J. W., McInroy, J. A., Liu, K., Hu, C. H. (2013). Symptoms of fern distortion syndrome resulting from inoculation with opportunistic endophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *PLoS ONE*, 8(3): e58531.
- Knauth, S., Hurek, T., Brar, D., Reinhold-Hurek, B. (2005). Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.*, 7: 1725-33.
- Kong, Q., Dong, S., Gao, J., and Jiang, C. (2016). In vitro fermentation of sulfated polysaccharides from *E. prolifera* and *L. japonica* by human fecal microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 867–871.
- Kõiv, V., Roosaare, M., Vedler, E., Ann Kivistik, P., Toppi, K., Schryer, D. W., Remm, M., Tenson, T., and Mäe, A. (2015). Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers. *Scientific Reports*, 5, 1–18.
- Lang, J. M., Eisen, J. A., and Zivkovic, A. M. (2014). The microbes we eat: abundance and taxonomy of microbes consumed in a day's worth of meals for three diet types. *PeerJ*, 2: e659.
- Leff, J. W. and Fierer, N. (2013). Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. *PLoS ONE*, 8(3), 1–9.
- Leitch, E. C. M., Walker, A. W., Duncan, S. H., Holtrop, G. and Flint, H. J. (2007). Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. *Environ Microbiol*, 9, 667–679.

- Liu, Y., Zhao, F., Liu, J., Wang, H., Han, X., Zhang, Y., and Yang, Z. (2017). Selection of Cholesterol-Lowering Lactic Acid Bacteria and its Effects on Rats Fed with High-Cholesterol Diet. *Current Microbiology*, 74(5), 623–631.
- Logan, A. C., Katzman, M. A., and Balanzá-Martínez, V. (2015). Natural environments, ancestral diets, and microbial ecology: is there a modern “paleo-deficit disorder”? Part II. *Journal of Physiological Anthropology*, 34(1), 9
- Louis, P. and Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 1–8.
- Louis, P., Scott, K. P., Duncan, S. H. and Flint, H. J. (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1197–1208.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S.,...Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102.
- Matijašić, B. B., Obermajer, T., Lipoglavšek, L., Grabnar, I., Avguštin, G., & Rogelj, I. (2014). Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *European Journal of Nutrition*, 53(4), 1051–1064.
- McInroy, J. A., Kloepper, J.W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil*. 173(2): 337-342.
- McNear Jr., D. H. (2013). The rhizosphere - roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge* 4(3): 1.
- Mena, C., Fuentes, E., Ormazábal, Y., Palomo-Vélez, G., and Palomo, I. (2015). Role of access to parks and markets with anthropometric measurements, biological markers, and a healthy lifestyle. *Int J Environ Health Res*, 25(4):373-83.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I.,... Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332: 1097-1100.

- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 634-663.
- Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., Stanys, V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: A review. *Zemdirbyste*, 102(4): 465-478.
- Misaghi, I. J., Donndelinger, C. R. (1990). Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.
- Moschen, A. R., Wieser, V., Tilg, H. (2012). Dietary factors: Major regulators of the gut's microbiota. *Gut and Liver*, 6(4): 411-416.
- Munif, A., Hallmann, J., Sikora, R. A. (2012). Isolation of endophytic bacteria from tomato and their biocontrol activities against fungal diseases. *Microbiology Indonesia*, 6(4): 148-156.
- Müller, P., Döring, M. (2009). Isothermal DNA amplification facilitates the identification of a broad spectrum of bacteria, fungi and protozoa in *Eleutherococcus* sp. plant tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 98: 35-45.
- Nithya, A., & Babu, S. (2017). Prevalence of plant beneficial and human pathogenic bacteria isolated from salad vegetables in India. *BMC Microbiology*, 17(1), 64.
- Ofek-Lalzar, M., Sela, N., Goldman-Voronov, M., Green, S.J., Hadar, Y., Minz, D. (2014). Niche and host-associated functional signatures of the root surface microbiome. *Nat. Commun.* 5: 4950.
- Pereira, P., Ibáñez, F., Rosenblueth, M., Etcheverry, M., Martínez-Romero, E. (2011). Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. *ISRN Ecol*, 2011: 938546.
- Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., Tomaro-Duchesneau, C. (2011). Gut microbiota: Next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, 5: 71-86.

Ramette, A., Frapolli, M., Saux, M. F. Le, ... Moënne-Loccoz, Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(3): 180-188.

Rascovan, N., Carbonetto, B., Perrig, D., Diaz, M., Canciani, W., Abalo, M., Alloati, J., González-Anta, G. and Vazquez M.P. (2016) Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. *Scientific Reports* 6, 28084.

Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (1998). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17: 29-54.

Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2006). Endophytic associations of *Azoarcus* spp. in associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 191-210.

Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2011). Living inside plants: Bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14: 435-43.

Reinhold-Hurek, B., Wiebke, B., Burbano, C. S., Sabale, M., Hurek, T. (2015). Roots shaping their microbiome : Global hotspots for microbial activity. *Annual Review of Phytopathology*, 53: 403-424.

Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2004). *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of Microbiology*, 181 (5): 337–344.

Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : MPMI, 19(8): 827-837.

Round, J. L. and Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 9(5), 313–323.

- Schuijs, M. J., Willart, M. A., Vergote, K.,... Hammad, H. (2015). Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*, 349(6252), 1106–1110.
- Schreiter, S., Ding, G. C., Heuer, H., Neumann, G., Sandmann, M., Grosch, R., Kropf, S., Smalla, K. (2014). Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front. Microbiol.* 5: 144.
- Selhub, E. M., Logan, A. C., and Basted, A. C. (2014). Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. *Journal of Physiological Anthropology*, 33(1), 2.
- Seo, W. T., Lim, W. J., Kim, E. J., Yun, H. D., Lee, Y. H., Cho, K. M. (2010). Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53: 493–503.
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., ... Reinhold-Hurek, B. (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 25: 28-36.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., Wilhelm, E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 23-32.
- Shade, A., Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.*, 14: 4-12.
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J., and Lou, K. (2014). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(14), 6375–6385.
- Shidore, T., Dinse, T., Ohrlein, J., Becker, A., Reinhold-Hurek, B. (2012). Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Environ. Microbiol.*, 14: 2775-87.

- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., Berg, G. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4742-51.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L.,... Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731–16736.
- Sprent, J. I., de Faria, S. M. (1988). Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil*, 110: 157-165.
- Stępniewska, Z., Kuźniar, A. (2013). Endophytic microorganisms - promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22): 9589-9596.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299:1259–60
- Strobel, G., Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4), 491-502.
- Sturz, A. V. (1995). The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant Soil*, 175: 257-263.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G. (1998). Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial alleopathy. *Can. J. Microbiol.*, 44: 162-167.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 19: 1-30.
- Zachow, C., Tilcher, R., Berg, G. (2008). Sugar beet-associated bacterial and fungal communities show a high indigenous antagonistic potential against plant pathogens. *Microb. Ecol.*, 55: 119-129.

- Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P. and Flint, H. J. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* 6, 1535–1543 (2012).
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G., Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5): 2198-2208.
- Tan, Z., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B.. (2003). Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.* 5: 1009-15.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, ... Leclerc, M. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.*, 11: 2574-2584.
- Teixeira, L. C., Peixoto, R. S., Cury, J. C., Sul, W. J., Pellizari, V. H., Tiedje J., and Rosado, A.S. (2010) Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. *ISME J.*, 4:989–1001.
- Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., and Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature*, 535 (7610), 65–74.
- Trémouillaux-Guiller, J., Rohr, T., Rohr, R., Huss, V. A. R. (2002). Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba*. *Am. J. Bot.*, 89: 727-733.
- Tringe, S. G., von Mering, C., Kobayashi, A., ... Rubin E. M. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308(5721): 554-557.
- Vokou, D., Vareli, K., Zarali, E., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I. A., Monokrousos, N.,...Sainis, I. (2012). Exploring Biodiversity in the Bacterial Community of the Mediterranean Phyllosphere and its Relationship with Airborne Bacteria. *Microbial Ecology*, 64(3), 714–724.
- Walker, A. W., Duncan, S. H., McWilliam Leitch, E. C., Child, M. W. and Flint, H. J. (2005) pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3692–3700.

Wilson, D. (1995). Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274-276.

Wold, A. E. (1998). The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy*, 53(46 Suppl): 20-5.

Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., ... Li, H. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052): 105-109.

You, C.B., Lin, M., Fang, X. J., Song, W. (1995). Attachment of *Alcaligenes* to rice roots. *Soil Biol. Biochem.* 27: 463-466.

Yuan, S., Cohen, D. B., Ravel, J., Abdo, Z., and Forney, L. J. (2012). Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS ONE*, 7(3).

Kasutatud raamatud

Bouizgarne, B. 2013. Bacteria for plant growth promotion and disease management. *In* Maheshwari, D. K. (ed.) *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Di Fiore, S., Del Gallo, M. 1995. Endophytic bacteria: their possible role in the host plant. *In* Fendrik, I., del Gallo, M., Vanderleyden J., de Zamaroczy M. (eds) *Azospirillum VI and Related Microorganisms*. NATO ASI Series (Series G: Ecological Sciences), vol 37. Springer, Berlin, Heidelberg.

Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves, p. 179-197. *In* Andrews, J. H., Hirano, S. S. (ed.). *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, New York.

Schulz, B., Boyle, C. 2006. What are endophytes? p. 1-13 *In* Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T. N. (ed.), *Microbial root endophytes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Kasutatud veebiaadressid

Oksanen, J. (2016). Vegan: ecological diversity : <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vignettes/diversity-vegan.pdf> (last visited 14.05.17)

SILVA andmebaas: <http://www.arb-silva.de/> (last visited 28.05.16)

SparCC funktsioon: <https://github.com/MPBA/r-sparcc> (08.05.2017)

Lisa 1. Kõikide (esimene+teine) sekveneerimisandmete kirjeldus proovides

Proov	OTUde arv >0 sekvensi	OTUde arv >10 sekvensi	OTUde arv >100 sekvensi	Sekvenside summa	sum(OTU >10 sekvensi)	sum(OTU >100 sekvensi)	Sekvensid ilma mito ja klorota ¹
kark1 ²	77	19	8	170143	169998	169592	156674
kark2 ²	162	43	9	190122	189809	188772	181198
kark3 ²	142	29	8	235790	235515	234976	231031
kark4 ²	162	37	8	212819	212491	211615	197654
kark5 ²	113	15	4	166307	166055	165827	152918
kars1 ³	355	141	40	87912	87116	84126	42594
kars2 ³	34	8	7	133434	133387	133355	121488
kars3 ³	20	9	8	180948	180911	180863	164718
kars4 ³	25	10	5	147108	147071	146929	132270
kars5 ³	49	8	3	149420	149320	149098	135362
kalk1 ⁴	255	89	30	20954	20472	18182	19227
kalk2 ⁴	277	99	37	162196	161644	159438	161245
kalk3 ⁴	269	105	37	199656	199099	196825	195953
kalk4 ⁴	273	103	43	130544	129972	127802	127757
kalk5 ⁴	386	169	51	161060	160250	155951	158181
kals1 ⁵	189	75	28	104655	104237	102827	38900
kals2 ⁵	117	36	14	111168	110910	110296	31224
kals3 ⁵	56	18	6	152304	152167	151905	146888
kals4 ⁵	182	58	12	99818	99400	97883	15753
kals5 ⁵	84	18	9	230773	230601	230268	216975
pek1 ⁶	262	106	33	194251	193724	191201	190252
pek2 ⁶	238	91	23	129654	129143	126943	126916
pek3 ⁶	189	55	16	147273	146858	145763	142333
pek4 ⁶	291	98	32	116952	116350	113978	108386
pek5 ⁶	279	89	24	173345	172767	170430	166254
pes1 ⁷	41	20	12	140294	140232	140017	130615
pes2 ⁷	45	12	7	197245	197160	196949	187995
pes3 ⁷	41	12	6	136156	136092	135920	134886
pes4 ⁷	46	12	7	189671	189592	189476	178334
pes5 ⁷	43	10	4	140131	140059	139949	129837
pork1 ⁸	253	49	10	189939	189275	188187	183893
pork2 ⁸	225	59	10	171531	171077	169749	165065
pork3 ⁸	289	71	16	218738	218089	216439	208576
pork4 ⁸	229	54	9	208154	207626	206329	197134

pork5 ⁸	236	57	11	217725	217205	215738	212881
pors1 ⁹	34	12	8	175976	175938	175789	163213
pors2 ⁹	33	15	7	130460	130419	130185	113973
pors3 ⁹	49	15	9	131140	131035	130757	119144
pors4 ⁹	32	18	8	165464	165433	165191	147617
pors5 ⁹	60	21	9	177798	177689	177225	172727
topk1 ¹⁰	141	21	12	125742	125446	125221	123006
topk2 ¹⁰	212	40	11	198950	198403	197805	185546
topk3 ¹⁰	168	22	8	172023	171593	171307	165090
topk4 ¹⁰	182	30	10	165327	164892	164309	157112
topk5 ¹⁰	211	41	10	159529	158990	158193	149176
tops ¹¹	219	40	13	98789	98235	97560	90777
tops2 ¹¹	56	17	9	121413	121305	121032	108706
tops3 ¹¹	53	16	11	143303	143174	143061	134701
tops4 ¹¹	57	18	8	76804	76692	76465	63091
tops5 ¹¹	63	20	11	167432	167290	167081	149510

¹ Sekventside arv peale mitokondrite ja kloroplastide, ² kartuli koor, ³ kartuli sisu, ⁴ kaalika koor, ⁵ kaalika sisu, ⁶ peedi koor, ⁷ peedi sisu, ⁸ porgandi koor, ⁹ porgandi sisu, ¹⁰ maapirni koor, ¹¹ maapirni sisu.

Lisa 2. Esimese sekveneerimise andmete kirjeldus proovides

Proov	OTUde arv >0	OTUde arv >10	OTUde arv >100	Sekventside summa	sum(OTU >10 sekventsi)	sum(OTU >100 sekventsi)	Sekventsid ilma mito ja klorota ¹
kark1 ²	12	3	2	13317	13301	13239	15
kark2 ²	136	33	4	10137	9878	9073	1256
kark3 ²	99	14	2	5273	5040	4707	537
kark4 ²	126	28	2	15630	15381	14643	924
kark5 ²	99	10	3	13815	13586	13447	430
kars1 ³	86	16	3	8771	8593	8314	611
kars2 ³	16	3	2	11683	11661	11629	16
kars3 ³	6	3	2	16219	16214	16166	3
kars4 ³	11	3	2	14679	14663	14611	8
kars5 ³	10	3	2	13995	13984	13924	7
kalk1 ⁴	246	86	28	12958	12503	10302	11236
kalk2 ⁴	223	75	18	7764	7296	5049	6840
kalk3 ⁴	196	66	14	8204	7803	5925	4565
kalk4 ⁴	231	91	38	15329	14864	12957	12564
kalk5 ⁴	335	140	43	27048	26388	22908	24197
kals1 ⁵	55	14	4	11983	11865	11625	640
kals2 ⁵	16	5	3	8771	8741	8666	97
kals3 ⁵	36	13	4	8995	8917	8770	3853
kals4 ⁵	28	7	2	14609	14574	14447	105
kals5 ⁵	42	4	3	12723	12631	12604	112
pek1 ⁶	220	79	15	8901	8467	6257	4934
pek2 ⁶	193	65	11	7648	7198	5543	4928
pek3 ⁶	159	34	5	6361	5977	5373	1426
pek4 ⁶	246	81	12	13820	13309	10875	5343
pek5 ⁶	241	70	10	11219	10690	8611	4148
pes1 ⁷	14	3	2	9626	9610	9599	10
pes2 ⁷	17	3	2	9027	8997	8982	27
pes3 ⁷	5	2	2	1251	1248	1248	2
pes4 ⁷	26	3	2	11156	11105	11089	50
pes5 ⁷	24	4	3	10905	10873	10808	2523
pork1 ⁸	221	36	3	7631	7037	6050	1753
pork2 ⁸	204	44	3	8011	7593	6456	1628
pork3 ⁸	234	47	7	12860	12314	10987	2709
pork4 ⁸	196	46	3	12631	12173	11041	1668

pork5 ⁸	201	49	6	8801	8373	7031	3986
pors1 ⁹	13	3	2	11678	11653	11632	11
pors2 ⁹	10	4	2	15452	15439	15400	4
pors3 ⁹	18	3	2	12013	11981	11970	30
pors4 ⁹	12	7	2	17050	17034	16943	51
pors5 ⁹	43	19	7	16318	16250	15794	11270
topk1 ¹⁰	118	14	8	4216	3958	3795	1493
topk2 ¹⁰	177	29	5	14454	14018	13466	1090
topk3 ¹⁰	130	13	4	7570	7256	6991	645
topk4 ¹⁰	148	22	7	9929	9604	9213	1721
topk5 ¹⁰	177	30	7	12466	12055	11421	2122
tops1 ¹¹	207	35	10	12823	12298	11663	4819
tops2 ¹¹	30	6	3	12618	12549	12500	11
tops3 ¹¹	27	4	3	8595	8524	8510	5
tops4 ¹¹	37	5	3	13727	13620	13585	22
tops5 ¹¹	32	7	3	17838	17758	17688	7

¹ Sekventside arv peale mitokondrite ja kloroplastide eemaldamist, ² kartuli koor, ³ kartuli sisu, ⁴ kaalika koor, ⁵ kaalika sisu, ⁶ peedi koor, ⁷ peedi sisu, ⁸ porgandi koor, ⁹ porgandi sisu, ¹⁰ maapirni koor, ¹¹ maapirni sisu.

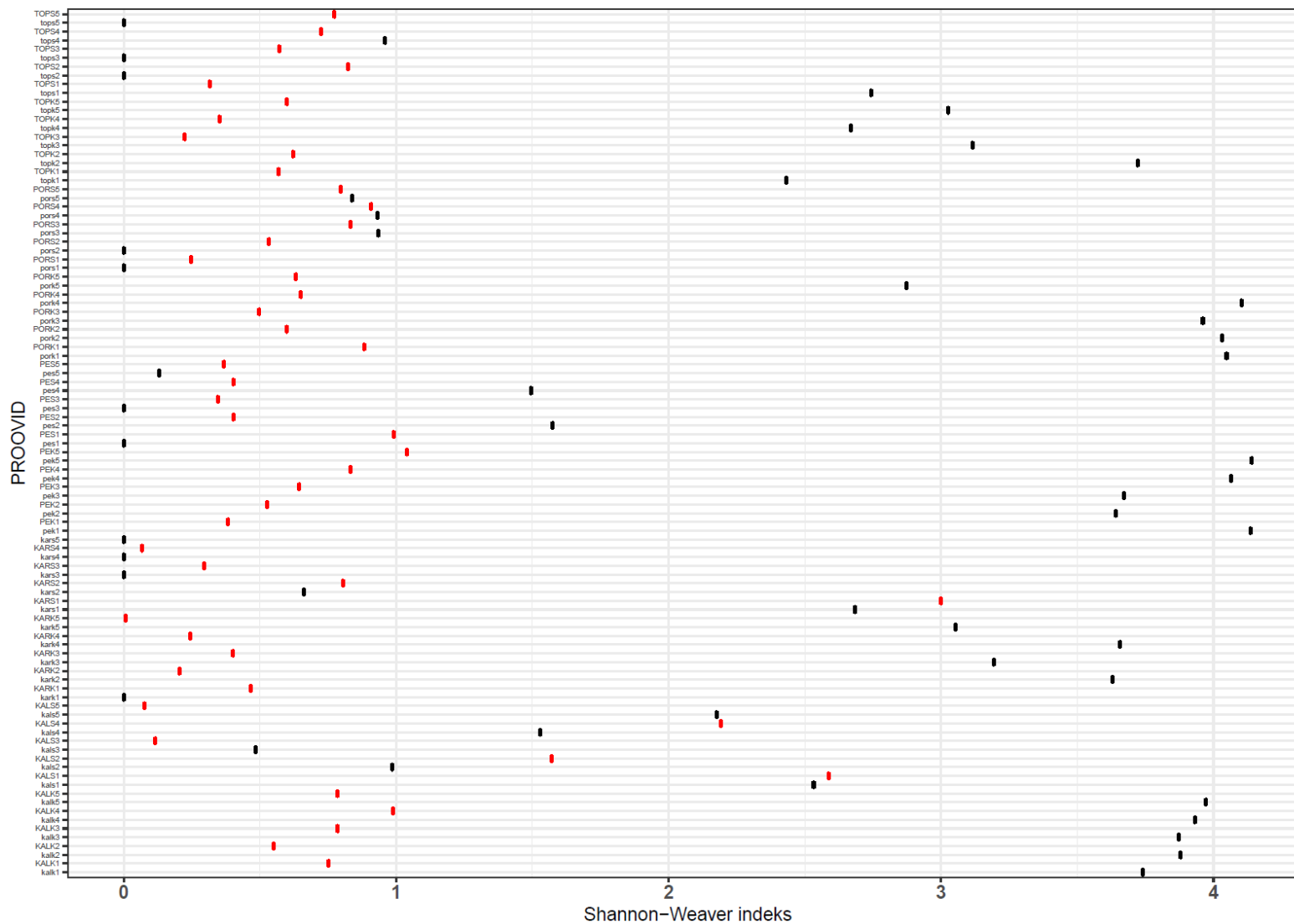
Lisa 3. Teise sekveneerimise andmete kirjeldus proovides

Proov	OTUde arv >0 sekvensi	OTUde arv >10 sekvensi	OTUde arv >100 sekvensi	Sekvenside summa	sum(OTU >10 sekvensi)	sum(OTU >100 sekvensi)	Sekvensid ilma mito ja klorota ¹
KARK1 ²	69	17	7	156826	156696	156353	156659
KARK2 ²	73	19	6	179985	179835	179427	179942
KARK3 ²	75	15	6	230517	230358	230138	230494
KARK4 ²	77	17	6	197189	197036	196809	196730
KARK5 ²	28	6	1	152492	152454	152373	152488
KARS1 ³	347	138	38	79141	78353	75380	41983
KARS2 ³	19	6	6	121751	121726	121726	121472
KARS3 ³	15	7	6	164729	164697	164683	164715
KARS4 ³	16	8	4	132429	132407	132317	132262
KARS5 ³	42	6	1	135425	135333	135106	135355
KLK1 ⁴	79	18	3	7996	7836	7407	7991
KLK2 ⁴	193	56	20	154432	154024	152537	154405
KLK3 ⁴	189	74	22	191452	191077	189060	191388
KLK4 ⁴	156	56	12	115215	114930	113306	115193
KLK5 ⁴	245	90	20	134012	133464	131101	133984
KLS1 ⁵	185	73	27	92672	92262	90915	38260
KLS2 ⁵	113	36	13	102397	102156	101529	31127
KLS3 ⁵	44	10	4	143309	143199	143061	143035
KLS4 ⁵	176	57	10	85209	84806	83252	15648
KLS5 ⁵	59	16	7	218050	217943	217623	216863
PEK1 ⁶	151	52	15	185350	185008	183852	185318
PEK2 ⁶	148	45	15	122006	121710	120817	121988
PEK3 ⁶	86	22	12	140912	140742	140300	140907
PEK4 ⁶	141	44	17	103132	102855	101917	103043
PEK5 ⁶	120	32	13	162126	161823	161377	162106
PES1 ⁷	29	18	10	130668	130621	130367	130605
PES2 ⁷	37	10	6	188218	188156	187960	187968
PES3 ⁷	39	11	4	134905	134844	134651	134884
PES4 ⁷	28	10	6	178515	178469	178365	178284
PES5 ⁷	25	9	3	129226	129186	129076	127314
PORK1 ⁸	75	12	7	182308	182120	181923	182140
PORK2 ⁸	67	16	7	163520	163401	163154	163437

PORK3 ⁸	153	33	7	205878	205579	204874	205867
PORK4 ⁸	61	13	6	195523	195400	195175	195466
PORK5 ⁸	96	16	5	208924	208705	208400	208895
PORS1 ⁹	25	10	7	164298	164280	164152	163202
PORS2 ⁹	25	12	6	115008	114978	114783	113969
PORS3 ⁹	37	12	7	119127	119043	118776	119114
PORS4 ⁹	23	13	7	148414	148398	148237	147566
PORS5 ⁹	33	9	5	161480	161423	161280	161457
TK1 ¹⁰	43	12	5	121526	121457	121240	121513
TK2 ¹⁰	78	11	6	184496	184300	184172	184456
TK3 ¹⁰	59	8	4	164453	164287	164234	164445
TK4 ¹⁰	62	10	4	155398	155231	154984	155391
TK5 ¹⁰	82	14	4	147063	146857	146627	147054
TS1 ¹¹	27	7	5	85966	85899	85855	85958
TS2 ¹¹	29	12	6	108795	108751	108427	108695
TS3 ¹¹	29	12	8	134708	134643	134544	134696
TS4 ¹¹	27	12	5	63077	63043	62866	63069
TS5 ¹¹	35	14	8	149594	149530	149302	149503

¹ Sekventside arv peale mitokondrite ja kloroplastide eemaldamist, ² kartuli koor, ³ kartuli sisu, ⁴ kaalika koor, ⁵ kaalika sisu, ⁶ peedi koor, ⁷ peedi sisu, ⁸ porgandi koor, ⁹ porgandi sisu, ¹⁰ maapirni koor, ¹¹ maapirni sisu.

Lisa 4. Shannon-Weaver indeksid kahe sekvenerimise proovides. Mustaga on esimese sekvenerimise proovid ja punasega teise sekvenerimise proovid.



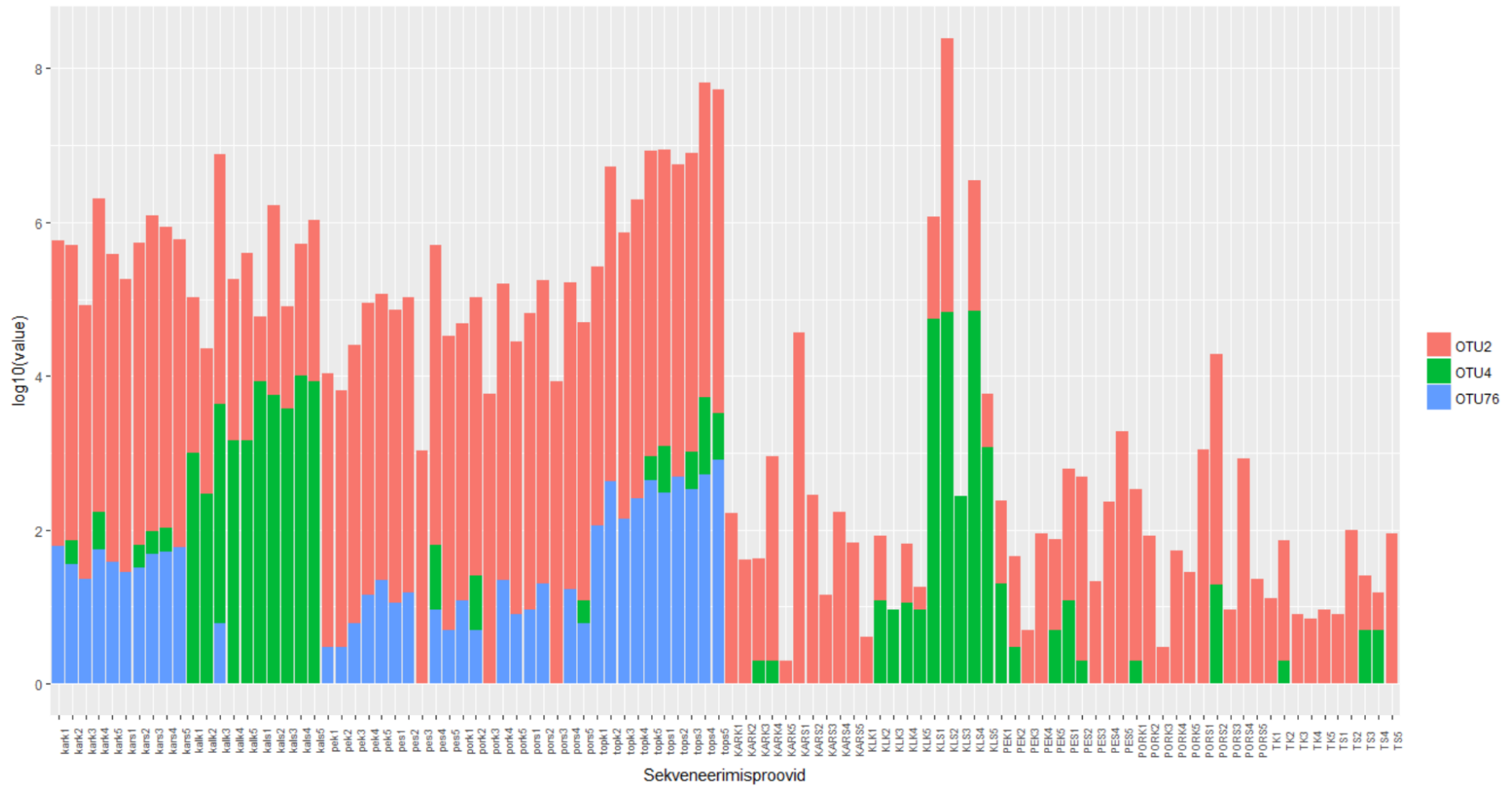
Lisa 5. Juurvilja isendite koore ja sisu Shannon-Weaver indeksid. Andmekogu 50.

KOOR		SISU	
Proov	Shannon-Weaver indeks	Proov	Shannon-Weaver indeks
Kaalika koor 1	2,615742753	Kaalika sisu 1	2,307709139
Kaalika koor 2	2,635165107	Kaalika sisu 2	1,030062041
Kaalika koor 3	2,668283659	Kaalika sisu 3	0,835973426
Kaalika koor 4	2,846574239	Kaalika sisu 4	1,384961087
Kaalika koor 5	2,793249968	Kaalika sisu 5	0,720766081
Kartuli koor 1	0,453506867	Kartuli sisu 1	2,275810134
Kartuli koor 2	2,00877097	Kartuli sisu 2	0,803123558
Kartuli koor 3	1,612278294	Kartuli sisu 3	0,292983906
Kartuli koor 4	2,145463074	Kartuli sisu 4	0,065004499
Kartuli koor 5	0,978170766	Kartuli sisu 5	0,007831381
Peedi koor 1	2,653071065	Peedi sisu 1	0,984783896
Peedi koor 2	2,42504213	Peedi sisu 2	0,400368099
Peedi koor 3	2,033938538	Peedi sisu 3	0,33895129
Peedi koor 4	2,840742191	Peedi sisu 4	0,399522384
Peedi koor 5	2,951521231	Peedi sisu 5	0,256414549
Porgandi koor 1	2,414926216	Porgandi sisu 1	0,247083528
Porgandi koor 2	2,419318684	Porgandi sisu 2	0,529228343
Porgandi koor 3	2,437683323	Porgandi sisu 3	0,825366639
Porgandi koor 4	2,309224272	Porgandi sisu 4	1,14530413
Porgandi koor 5	1,729334863	Porgandi sisu5	1,088719038
Maapirni koor 1	1,549169034	Maapirni sisu 1	1,760805396
Maapirni koor 2	1,830817512	Maapirni sisu 2	0,819776886
Maapirni koor 3	1,446251558	Maapirni sisu 3	0,5657764
Maapirni koor 4	1,658467531	Maapirni sisu 4	0,716955811
Maapirni koor 5	1,788462842	Maapirni sisu 5	0,768220774

Lisa 6. Juurviljade koore ja sisu Shannon-Weaver indeksid. Andmekogu 10.

Juurvilja osa	Shannon-Weaver indeks
Kaalika koor	2,899048418
Kaalika sisu	1,736504666
Kartuli koor	1,995394918
Kartuli sisu	2,144958568
Peedi koor	2,865473446
Peedi sisu	0,876442523
Porgandi koor	2,517788571
Porgandi sisu	1,548280686
Maapirni koor	1,795566165
Maapirni sisu	1,282360419

Lisa 7. I ja II sekveneermise andmete mitokondri OTUde jaotus (näidatud ainult kolm suuremat OTUt). Vasakult paremale esimese ja seejärel teise sekveneermise proovid.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Krõõt Arbo

(sünnikuupäev: 29.03.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Endofüütsed bakterid Eestis kasvatatavates juurviljades”, mille juhendajateks on Viia Kõiv ja Ülo Maiväli.

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2017