

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
Ökoloogia- ja Maateaduste Instituut
Mükoloogia õppetool

Eveli Otsing

**Ektomükoriisete seente ajaline dünaamika ja liigi *Tuber
melanosporum* püsimine hariliku tamme juurtel Põhja-Euroopas**

Magistritöö

Juhendaja: Leho Tedersoo, PhD

Tartu 2014

Sisukord

Sissejuhatus	3
Materjal ja meetodika	5
Uuringuala	5
Proovide kogumine	5
Molekulaarsed analüüsid	6
Järjestuste töötlemine	7
Statistilised analüüsid	7
Tulemused	8
Arutelu	10
Kokkuvõte	11
Kasutatud kirjanduse loetelu	13
Tänuavaldused	16
Summary	17
Lisa 1	19

Sissejuhatus

Trühvlid (*Tuber* spp.) on maa-aluste viljakehadega ektomükoriissed seened. Mitmete trühvliliikide, näiteks liigi *Tuber melanosporum* Vittad. (Périgordi trühvel) viljakehad on organoleptiliste omaduste tõttu kõrge kulinaarse väärtusega (Mello *et al*, 2006; Trappe *et al*, 2010). Trühvlite majanduslik väärtus on innustanud teadlasi ja ettevõtjaid välja töötama meetodeid trühvlite efektiivseks kultiveerimiseks erinevate kliimaatiliste ja edaafiliste tingimustega piirkondades (Hall ja Yun, 2001).

Ektomükoriissete seente kooslused hõlmavad sadasid liike ning nende koosluste koosseisu mõjutavad paljud erinevad taimestiku ja mullastikuga seotud parameetrid. Teatud keskkonningimuste kombinatsioon on ka hädavajalik trühvliliikide eksisteerimiseks ja reproduktsiooniks – viljakehade moodustamiseks ja küpsemiseks. Lisaks taimestikule ja mullaparameetritele on olulised ka muud ektomükoriissed seened, mis muutuvad samal juuresüsteemil trühvlite konkurentideks. Seetõttu on oluline suuta võimalikult täpselt määrata nii trühvliliigid kui ka muud potentsiaalsed konkureerivad ektomükoriissed seened ning jälgida nende ajalist dünaamikat trühvliistandustes (Baciarelli-Falini *et al*, 2006). Kohalike ektomükoriissete seente mõju trühvliliikidele on tugevaim esimesel aastal pärast puude istutamist. Suure tõenäosusega asendub inokuleeritud trühvliliik konkurentsitingimustes tugevamate kohalike ektomükoriissete seeneliikidega (de Miguel *et al*, 2014).

Tuber melanosporum eelistab vahemerelist kliimat ja neutraalse kuni aluselise reaktsiooniga muldi (Bruhn ja Hall, 2011). *T. melanosporum* on kitsa levilaga liik, mida võib looduslikult leida vaid Lõuna- ja Lääne-Euroopa riikidest (Itaalia, Prantsusmaa ja Hispaania) (Murat *et al*, 2004; Mello *et al*, 2006). Liigi *T. melanosporum* kultiveerimiseks ei sobi piirkonnad, kus muld talviti läbi külmub. Périgordi trühvlite looduslikes kasvukohtades küpsevad liigi viljakehad detsembrist märtsini. Piirkondades, kus muld talviti külmub, kahjustab kevadine sula viljakehasid (Bruhn ja Hall, 2011). Sellegipoolest on näidatud, et liigi *T. melanosporum* viljakehade moodustamiseks sobib üsna lai kliimaparameetrite vahemik.

Näiteks keskmine temperatuur talvekuudel võib varieeruda vahemikus 0,5–10,4 °C (Thomas, 2014). Siiski teatakse võrdlemisi vähe liigi *T. melanosporum* autökoloogiast, sealhulgas vastupidavusest varieeruvatele kliimatingimustele ja peremeestaimede levikust.

Trühvlite viljakehade moodustamiseks on vaja kahte omavahel sobivat paardumistüüpi, mille määrab *MAT* lookus (*mating type locus*) ja selle kaks erinevat versiooni – idiomorfi (Butler, 2007). Perekonna *Tuber* liigid on heterotalsed ehk eoskottides arenevad haploidseid kotteosed, millest iga eos omab ühte kahest paardumistüübist (Murat ja Martin, 2008). Liigi *T. melanosporum* genoomi sekveneerimine on kinnitanud kahe *MAT* geeni – *MAT1-2-1* ja *MAT1-1-1* – olemasolu (Rubini *et al*, 2011b; Rubini *et al*, 2014).

Käesoleva uurimuse eesmärk oli jälgida liigi *T. melanosporum* ja muude ektomükoriisete seente ajalist dünaamikat Eestisse istutatud 5-aastaste harilike tammede (*Quercus robur* L.) juurtel kolme aasta jooksul. Püstitasime hüpoteesi, mille kohaselt liigi *T. melanosporum* suhteline ohtrus väheneb ja muude ektomükoriisete seente liigirikkus ja suhteline ohtrus suurenevad aastate jooksul pärast istanduse rajamist. Samuti oli meie eesmärk määrata kahe paardumistüübi olemasolu ja sagedus, toetudes Rubini *et al* (2011b) välja töötatud metoodikale.

Materjal ja metoodika

Uuringuala

Liigiga *T. melanosporum* inokuleeritud tammed telliti Inglismaa ettevõttelt Mycorrhizal Systems Ltd. Tammeistikud pärinesid Inglismaalt kogutud tõrudest, ent inookulumi päritolu pole selge. Liigi *T. melanosporum* istandus rajati 2008. aastal Saare maakonda rähkse rendsiina tüüpi mullale. Istanduse ala oli varem karjatatud pool-looduslik rohumaa, kus rohurindes domineerivad kõrrelised. Karjamaa mullale lisati hektari kohta viis tonni purustatud lubjakivi, et tõsta mulla pH üle seitme. Istandus paikneb 58,59°N laiuskraadil. 2011. aastal oli keskmine temperatuur talvekuudel -6,1 °C, 2012. aastal -2,3 °C ning 2013. aastal -4,2 °C. Temperatuur varieerus 2011. aasta talvel keskmiselt 2,5 °C kuni -21,4 °C, 2012. aastal 7,3 °C kuni -15,1 °C ning 2013. aasta talvel 3,7 °C kuni -18,0 °C kraadini. 2011. aasta keskmine sademete hulk talvekuudel oli 65,5 mm, 2012. aastal 97,3 mm ning 2013. aastal 53,9 mm (www.emhi.ee, Virtsu meteoroloogiajaam).

Proovide kogumine

Igal aastal koguti 30 juureproovi (v.a. 2013 – 31 juureproovi) juunis või juulis vahemikus 2011–2013. Igal aastal koostati valim 30st juhuslikult valitud puust ning igalt puult võeti üks juureproov. Proovid koguti 50 mm diameetrise plasttoruga 8 cm sügavuselt 5-10 cm kauguselt puu tüvest. Iga proovi puhul kontrolliti tammejuurte olemasolu. Juureproovid asetati koos mullaga plastikkotti, et säilitada niiskust, ning analüüsiti 48 h jooksul pärast kogumist. Juured puhastati ettevaatlikult veega ja vaadeldi neid Carl Zeiss Stemi 2000-CS stereomikroskoobiga. Vaatluse alla võeti vaid elujõulised juured. Iga juureproovi puhul jagati morfotüüpideks kõik ektomükoriissed juuretippud, võttes aluseks juuretippude värvuse, mantli pinnastruktuuri, väljaulatuvate hüüfide või risomorfide olemasolu. Iga morfotüübi suhtelise ohtruse hindamiseks vaadeldi kõiki juuretippe juureproovis. Iga juureproovi puhul valiti igast morfotüübist kõige värskemad juuretippud ning säilitati need CTAB puhvril (1% tsetüültrimetüülammoonium-bromiid, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA)

molekulaarseks analüüsideks. Igast morfotüübist valiti üks juuretipp molekulaarseks identifitseerimiseks.

Molekulaarsed analüüsid

Seensümbiontide molekulaarseks identifitseerimiseks eraldati DNA ektomükoriisest juuretippudest, kasutades komplekti DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK), järgides tootja juhiseid. Amplifitseeriti ribosomaalse DNA ITS-regioon, kasutades praimerit ITSOF-T (5'-acttggtcatttagaggaagt-3') kombinatsioonis praimeritega LB-W (5'-ctttcatctttcctcacgg-3') või LR3-Pez (5'-cmtcrggatcggtcgatgg-3') (Tedersoo *et al*, 2008). PCR-analüüsi nurjumise korral kombineeriti praimerit ITSOF-T universaalse praimeriga ITS4 (White *et al*, 1990), et amplifitseerida lühemat fragmenti seene DNAST. Kuna ligikaudu 20% kõigist morfotüüpidest jäid tuvastamata, kuigi DNA eraldati mitmetest juuretippudest ja ITS-regiooni amplifitseeriti mitmete praimeripaaridega, töötati välja uus liigi *T. melanosporum* spetsiifiline praimer ITS2TubMel-F (5'-taccagcatgaacgacg-3'). Praimer disainiti liigi *T. melanosporum* ja ka teiste perekonna *Tuber* liikide DNA järjestuste joondamise alusel. Praimer sobib *T. melanosporumi* DNA amplifitseerimiseks, andes teiste perekonna *Tuber* liikide puhul vähemalt kolm valepaardumist 3' otsas. Spetsiifilist praimerit kasutati kombineerituna universaalse praimeriga ITS4. Nende kombinatsioon annab liigi *T. melanosporum* DNA olemasolu korral ligikaudu 150 aluspaari pikkuse PCR-produkti. Uus praimer disainiti selleks, et produkt oleks võimalikult lühike ning võimaldaks saada tulemust ka lagunenu DNAga materjalist. Praimeripaari testimine teiste trühvliliikide peal on pooleli.

Liigi *T. melanosporum* kahe paardumistüübi olemasolu määramiseks kombineeriti praimereid TmelMATp1 ja TmelMATp2 ning praimereid TmelMATp19 ja TmelMATp20 vastavalt Rubini *et al* (2011b) meetodikale. Paardumistüübi analüüsiks valiti juhuslikult 10 tamme ning iga puu puhul analüüsiti ühte liigi *T. melanosporum* mükoriisaga juuretippu.

PCR (*polymerase chain reaction*) segu sisaldas 5 µl 5x HOT FIREPol Blend Mastermix Ready to Load (Solis Biodyne, Tartu, Eesti), 0,6 µl märklaud-DNA, 0,5 µl mõlemat 20 µmol/ml praimerit ja 17,9 µl dsH₂O. PCR-programm termotsükleris oli järgnev: algne denaturatsioon 95 °C kraadi juures 15 minutit, seejärel 35 tsüklit: denaturatsioon 30 sekundit 95 °C juures, 30

sekundi jooksul 55 °C praimerite seondumine, ekstensioon 72 °C 1 minut, ning viimaseks lõplik ekstensioon 10 minutit 72 °C juures. PCR-produktid lahutati 1,5% agarosgeelil 0.5X TBE puhvris (45mM Tris Base, 45mM boorhape, 1 mM EDTA (pH 8,0)). Produktid visualiseeriti UV-valguses ja puhastati Exo-Sap ensüümide abil (Sigma, St Louis, MO, USA). Amplifitseeritud DNA saadeti praimeritega ITS5 või ITS4 (White *et al*, 1990) sekveneerimisele firmasse Macrogen, Inc. Hollandis.

Järjestuste töötlemine

Sekveneerimise käigus saadud järjestused koondati kontiigideks ning nende töötlemiseks kasutati Sequencher 4.10 tarkvara (GeneCodes Corp., Ann Arbor, MI, USA). Liikide eraldamiseks kasutati 98,0% ITS2-regiooni sarnasusemäära (Tedersoo *et al*, 2006). Saadud järjestuste taksonoomilise kuuluvuse kindlaks tegemiseks kasutati BLASTn otsingut andmebaasides INSD (*International Nucleotide Sequence Databases*) ja UNITE (Abarenkov *et al*, 2010).

Statistilised analüüsid

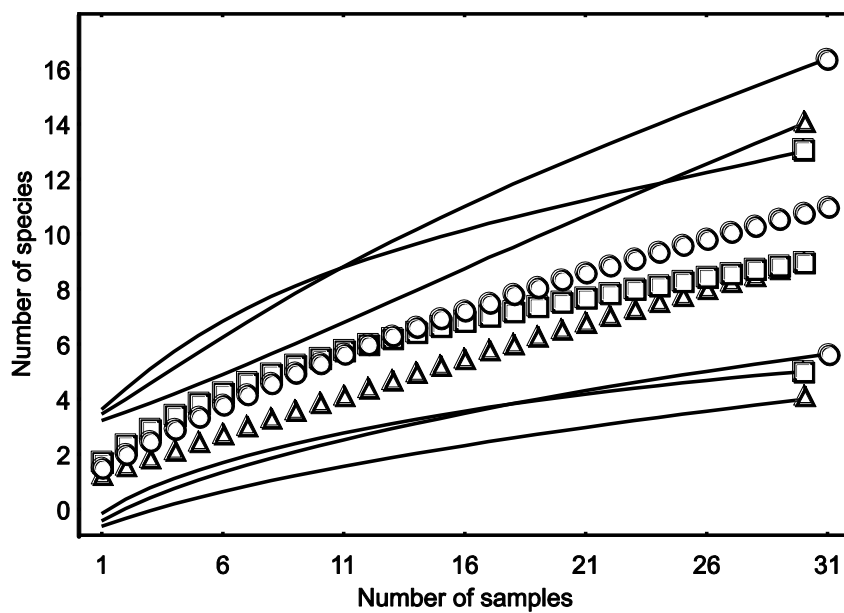
Üldise ektomükoriisse kolonisatsioonitaseme, liigi *T. melanosporum* ja muude ektomükoriisete liikide ohtruse ning ektomükoriisete liigirikkuse hindamiseks kasutati dispersioonianalüüsi (ANOVA). Üldise liigirikkuse hindamiseks 2011., 2012. ja 2013. aastal konstrueeriti liikide akumulatsioonikõverad ja nende 95% usalduspiirid, mille koostamiseks kasutati programmi EstimateS v.9 (Colwell, 2011). Aasta ja ruumi mõju hindamiseks ektomükoriisse seenekoosluse struktuurile kasutati permutatsioonilist dispersioonanalüüsi PERMANOVA+ PRIMER v.6 jaoks (Anderson *et al*, 2008). Koosluse distantsimaatriks koostati liikide esinemise/puudumise alusel, kasutades Bray–Curtis (Sørensen) dissimilaarsuse hinnangut ja 999 permutatsiooni.

Tulemused

Üldine ektomükoriisne kolonisatsioonitase vähenes kolme vaatlusaasta jooksul. Keskmine ektomükoriisne juurte kolonisatsioonitase 2011. aastal oli 64,9%, 2012. aastal 69,7% ning 2013. aastal 44,3% ($F_{2,88}=9,82$; $P<0,001$). Seevastu liigi *T. melanosporum* suhtelise ohtruse tase, võrreldes muude ektomükoriissete seentega, kolme aasta jooksul vähenes, ent see trend ei olnud statistiliselt oluline ($F_{2,88}=0,84$; $P=0,437$). 2011. aastal oli suhteline kolonisatsioon 91,9%, 2012. aastal 92,8% ning 2013. aastal 86,7%. Sellegipoolest, liigi *T. melanosporum* sagedus (koloniseeritud puude arv) püsis kõigil aastatel 100%-line.

Kolme aasta jooksul registreeriti tammede juurtel 19 ektomükoriisset seeneliiki. Muude ektomükoriissete seente liigirikkus pisut suurenes – 2011. aastal määrati tammede juurtelt üheksa, 2012. aastal üheksa ning 2013. aastal 11 liiki ektomükoriiseseid seeni (Tabel 1). Keskmine ektomükoriissete seeneliikide arv (s.h. *T. melanosporum*) juureproovi kohta erines aastati, kuid mitteoluliselt. 2011. aastal esines taime kohta keskmiselt 1,3 seeneliiki, 2012. aastal 1,7 ning 2013. aastal 1,5 liiki ($F_{2,88}=2,59$; $P=0,081$). Ektomükoriissete seeneliikide akumulatsioonikõverad ei saavutanud platood, viidates sellele, et juureproovide arvu suurendamine kasvataks tuvastatavate liikide arvu (Joonis 1). Kattuvad usalduspiirid viitavad sellele, et kolme aasta lõikes liikide arv suurenes mitteoluliselt. Kõige sagedasemateks ja liigirikkamateks perekondadeks olid *Hebeloma* (hebel), *Hymenogaster* (maapähkel) ja *Tomentella* (sametkoorik) vastavalt viie, viie ja kolme liigiga, mis tuvastati kolme aasta vältel. Aastal ja puude ruumilisel paiknemisel ei olnud ektomükoriissete seente koosluse struktuurile mõju.

Tuvastati kahe *MAT* (*MAT1-2* ja *MAT1-1*) idiomorfi olemasolu trühvlitammede istanduses. *MAT* geenide määramine õnnestus kõikide liigi *T. melanosporum* juuretippude puhul (100%): iga analüüsitud liigi *T. melanosporum* DNA proov andis amplifitseerimisel tulemuseks *MAT1-2* või *MAT1-1* idiomorfi. Üks idiomorfidest domineeris (*MAT1-1*), hõlmates 75,0% amplifitseeritud juuretippudest.



Joonis 1. Harilike tammedega (*Quercus robur*) mükoriisat moodustavate ektomükoriisete seeneliikide akumulatsioonikõverad ja nende 95% usalduspiirid (jooned). Ringid, proovid aastast 2013; ruudud, proovid aastast 2012; kolmnurgad, proovid aastast 2011. Joonis on võetud avaldamisele saadetud artiklist Otsing ja Tedersoo (lisa 1).

Tabel 1. Ektomükoriisete seente määrangud, kolonisatsioonitase ja esinemissagedus harilike tammede (*Quercus robur*) istanduses kolme aasta lõikes.

Liigid	UNITE no.	Keskmine kolonisatsioon (%)			Sagedus (%)		
		2011	2012	2013	2011	2012	2013
<i>Cortinarius odorifer</i>	UDB019316	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	3,2
<i>Cortinarius walkeri</i>	UDB019317	0,0	0,03	0,0	0,0	3,3	0,0
<i>Hebeloma ammophilum</i>	UDB008778	0,7	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	UDB008776	0,3	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0
<i>Hebeloma incarnatum</i>	UDB019318	0,0	0,2	0,6	0,0	13,3	9,7
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	UDB019319	0,3	0,0	0,3	3,3	0,0	3,2
<i>Hebeloma vaccinum</i>	UDB008777	0,03	0,3	0,0	3,3	3,3	0,0
<i>Hymenogaster arenarius</i>	UDB019309	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	12,9
<i>Hymenogaster citrinus</i>	UDB008774	1,4	0,0	0,1	6,7	0,0	3,2
<i>Hymenogaster griseus</i>	UDB019320	0,0	2,2	1,3	0,0	26,7	6,5
<i>Hymenogaster megasporus</i>	UDB019321	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	3,2
<i>Hymenogaster niveus</i>	UDB019322	0,0	1,8	0,0	0,0	13,3	0,0
<i>Inocybe abjecta</i>	UDB019323	0,3	1,0	1,0	3,3	6,7	3,2
<i>Tomentella badia</i>	UDB019324	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	3,2
<i>Tomentella coerulea</i>	UDB019325	0,0	0,3	0,0	0,0	3,3	0,0
<i>Tomentella lateritia</i>	UDB019326	0,0	0,2	0,0	0,0	3,3	0,0
<i>Trichophaea woolhopeia</i>	UDB008783	1,0	0,0	0,06	3,3	0,0	3,2
<i>Tuber melanosporum</i>	UDB019327	60,8	64,3	37,9	100	100	100
<i>Tuber rufum</i>	UDB008781	0,03	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0

Arutelu

Liik *T. melanosporum* on looduslikult levinud Euroopa lõunaosas, mis viitab selle liigi puhul vahemerelise kliima ja pehmete talvede eelistusele (Mello *et al*, 2006; Bruhn ja Hall, 2011). Seetõttu on liigi *T. melanosporum* püsimine Põhja-Euroopa istanduses üllatav ja annab alust arvata, et kliima ei limiteeri trühvlite vegetatiivset kasvufaasi. Kuigi liigi *T. melanosporum* mükoriisa suhteline ohtrus kolme aasta vältel veidi kahanes, säilitas see seeneliik uuringu vältel muude ektomükoriisete seeneliikide üle dominantsuse. Sarnaseid ajalisi kolonisatsioonimustreid on sageli täheldatud ka edukates Lõuna-Euroopa trühvliistandustes (Garcia-Barreda ja Reyna, 2011; Sánchez *et al*, 2014).

Halvasti aklimatiseerunud tammed on tõenäoliselt vastuvõtlikumad kohalikele hästi adapteerunud ektomükoriisetele seentele, mis suudavad paremini juurestikku koloniseerida ja juuresüsteemil levida (de Miguel *et al*, 2014). Kohalike ektomükoriisete seente liigirikkus ja ohtrus suurenesid kolme aasta lõikes. Domineerivateks ektomükoriiseteks perekondadeks olid *Hymenogaster* ja *Hebeloma*, mis on tüüpilised rühmad teisteski neutraalse pHga muldadele rajatud noortes istandustes (Napoli *et al*, 2010; Belfiori *et al*, 2012; de Miguel *et al*, 2014). Väljakujunenud kooslustes on need perekonnad asendatud ektomükoriisete seeneperekondadega *Tomentella*, *Russula* (pilvik), *Cortinarius* (vöödik) jt. (Tedersoo *et al*, 2012). Käesoleva töö käigus ei leitud ühtegi liiki perekonnast *Russula*.

Hiljutised avastused liigi *T. melanosporum* seksuaalse paljunemise kohta kinnitavad, et tegu on heterotalse liigiga ja paardumistüüpide levikumustrid trühvlipopulatsioonides määravad viljakehade moodustumise (Rubini *et al*, 2014). Kahe paardumistüübi olemasolu kinnitab potentsiaalset viljakehade moodustamise võimet. Kahe idiomorfi suhteline sagedus on vastavuses Itaalias tehtud uuringutega (Rubini *et al*, 2011a). PCR kahe paari paardumistüüpi määravate praimeritega kinnitas omavahel sobivate idiomorfide olemasolu ning seega potentsiaali viljakehade moodustamiseks.

Kokkuvõte

Trühvlid (*Tuber* spp.) on ektomükoriisat ja maa-aluseid viljakehi moodustavad seened. Mitmete trühvliliikide, näiteks liigi *Tuber melanosporum* viljakehad on kõrge kulinaarse väärtusega. *T. melanosporum* on kitsa levilaga liik, mida võib looduslikult leida vaid Lõuna- ja Lääne-Euroopa riikidest (Itaalia, Prantsusmaa ja Hispaania). Liigi *T. melanosporum* viljakehad küpsevad talvekuudel, mistõttu arvatakse, et kultiveerimiseks ei sobi piirkonnad, kus muld talviti läbi külmub. Sellegipoolest kultiveeritakse liiki *T. melanosporum* varieeruvate kliimaatiliste tingimustega regioonides ka väljaspool looduslikku levilat.

Liik *T. melanosporum* on heterotalne – viljakehade moodustamine sõltub kahest reproduktsiooni kontrollivast paardumistüübist. Trühvlite viljakehade moodustamisele ja elumusele on mõju ka konkureerivatel ektomükoriissetel seentel. Seetõttu on oluline identifitseerida potentsiaalsed konkureerivad ektomükoriisid seened ja jälgida nende ajalist dünaamikat trühvliistandustes.

Antud uurimuse eesmärgiks oli jälgida liigi *T. melanosporum* ja muude ektomükoriissete seente kolonisatsiooni 5-aastaste harilike tammede (*Quercus robur* L.) juurtel kolme aasta jooksul ning määrata kahe paardumistüübi olemasolu ja sagedus. Püstitati hüpotees, mille kohaselt liigi *T. melanosporum* ohtrus väheneb ning muude ektomükoriissete seente liigirikkus ja ohtrus suurenevad aastate jooksul pärast istanduse rajamist.

Liigi *T. melanosporum* istandus rajati 2008. aastal Saare maakonda. Proovid koguti 2011., 2012. ja 2013. aastal juunis või juulis. Seeneliikide molekulaarseks määramiseks amplifitseeriti rakutuuma ribosomaalse DNA ITS-regiooni ning paardumistüüpide määramiseks amplifitseeriti *MAT* lookuse geenid.

Üldine ektomükoriisne kolonisatsioonitase vähenes kolme vaatlusaasta jooksul. Liigi *T. melanosporum* suhteline ohtrus, võrreldes muude ektomükoriissete seentega, kolme aasta jooksul vähenes, kuid mitteoluliselt – 2011. aastal oli selleks 91,9%, 2012. aastal 92,8% ning

2013. aastal 86,7%. Sellegipoolest leidis liiki *T. melanosporum* igas vaadeldud juureproovis. Kolme aasta jooksul registreeriti tamme juurtel 19 ektomükoriisset seeneliiki. Muude ektomükoriisete liikide suhteline ohtrus ja liigirikkus veidi kasvasid. Kõige sagedamad perekonnad olid *Hebeloma*, *Hymenogaster* ja *Tomentella*. Õnnestus amplifitseerida mõlemad paardumistüüpi määravad geenid. Üks paardumistüüp domineeris, hõlmates 75,0% amplifitseeritud juuretippudest.

Tuber melanosporum suudab püsida Põhja-Euroopa kliimas, vaatamata kolonisatsiooni vähenemisele tamme juurtel. Liigi *T. melanosporum* kolonisatsioon kolme aasta jooksul küll vähenes, kuid liik jäi muude ektomükoriisete seente üle domineerima. Liigi *T. melanosporum* hea vegetatiivne kasv ning kahe paardumistüübi olemasolu võimaldab arvata, et liigi *T. melanosporum* kultiveerimine põhjamaises kliimas on võimalik. Siiski jääb veel selgusetuks, kas Eesti lühikesed suved ning külmad talved sobivad viljakehade moodustamiseks ja küpsemiseks.

Kasutatud kirjanduse loetelu

Abarenkov K, Tedersoo L, Nilsson RH, Vellak K, Saar I, Veldre V, Parmasto E, Prous M, Aan A, Ots M, Kurina O, Ostonen I, Jõgeva J, Halapuu S, Põldmaa K, Toots M, Truu J, Larsson KH, Kõljalg U (2010) *PlutoF – a web based workbench for ecological and taxonomic research with an online implementation for fungal ITS sequences*. *Evol Bioinform* 6:189–196

Anderson MJ, Gorley RN, Clarke KR (2008) *PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and statistical methods*. PRIMER-E: Plymouth, UK.

Baciarelli-Falini L, Rubini A, Riccioni C, Paolocci F (2006) *Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made T. melanosporum plantation: description of novel truffle-like morphotypes*. *Mycorrhiza* 16:475–484

Belfiori B, Riccioni C, Tempesta S, Pasqualetti M, Paolocci F, Rubini A (2012) *Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated Tuber melanosporum truffle grounds*. *FEMS Microbiol Ecol* 81:547–561

Bruhn J, Hall M (2011) *Burgundy Black Truffle Cultivation in an Agroforestry Practice*. University of Missouri Center for Agroforestry. Agrofor in action. AF1015

Butler G (2007) *The evolution of MAT: the ascomycetes*. Raamatus: Heitman J, Kronstad JW, Taylor JW, Casselton L, (eds) *Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications*. ASM, Washington, DC, pp 3–18

Colwell RK (2011) *EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples*. Version 9. User's Guide and application published at <http://purl.oclc.org/estimates> (18 February 2014, date last accessed)

Garcia-Barreda S, Reyna S (2011) *Below-ground ectomycorrhizal community in natural Tuber melanosporum truffle grounds and dynamics after canopy opening*. *Mycorrhiza* doi: 10.1007/s00572-011-0410-2

Hall I, Yun W (2001) *Truffles and other edible mycorrhizal mushrooms – some new crops for the Southern Hemisphere*. Raamatus: *Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, Christchurch, New Zealand, pp 1–7

Mello A, Murat C, Bonfante P (2006) *Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy*. FEMS Microbiol Lett 260:1–8

de Miguel AM, Águeda B, Sánchez S, Parladé J (2014) *Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts: applying lessons learned to future truffle culture*. Mycorrhiza DOI 10.1007/s00572-013-0554-3

Murat C, Díez J, Luis P, Delaruelle C, Dupré C, Chevalier G, Bonfante B, Martin F (2004) *Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial recolonization routes of the Perigord truffle Tuber melanosporum*. New Phytol 164:401–411

Murat C, Martin F (2008) *Sex and truffles: first evidence of Perigord black truffle outcrosses*. New Phytol 180:260–263.

Napoli C, Mello A, Borra A, Vizzini A, Sourzat P, Bonfante P (2010) *Tuber melanosporum, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds*. New Phytol 185:237–247

Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Arcioni S, Martin F, Paolocci F (2011a) *Tuber melanosporum: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants*. New Phytol 189:723–735

Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Tisserant E, Arcioni S, Martin F, Paolocci F (2011b) *Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete Tuber melanosporum*. New Phytol 189:710–722

Rubini A, Riccioni C, Belfiori B, Paolocci F (2014) *Impact of the competition between mating types on the cultivation of Tuber melanosporum: Romeo and Juliet and the matter of space and time*. Mycorrhiza DOI 10.1007/s00572-013-0551-6

Sánchez S, Ágreda T, Águeda B, Martín M, De Miguel AM, Barriuso J (2014) *Persistence and detection of black truffle ectomycorrhizas in plantations: comparison between two field detection methods*. Mycorrhiza DOI 10.1007/s00572-014-0560-0

Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diédhiou AG, Henkel TW, Kjølner R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KG, Põlme S, Ryberg M, Smith ME, Kõljalg U (2012) *Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi*. Mol Ecol 21(17):4160-70 doi: 10.1111/j.1365-294X

Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, Abarenkov K, Suvi T, Saar I, Kõljalg U (2008) *Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers*. New Phytol 180: 479–490

Tedersoo L, Suvi T, Larsson E, Kõljalg U (2006) *Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow*. Mycol Res 110:734–748.

Thomas PW (2014) *An analysis of the climatic parameters needed for Tuber melanosporum cultivation incorporating data from six continents*. Mycosphere 5 (1):137–142

Trappe JM, Claridge AW (2010) *The hidden life of truffles*. Sci Am 302:78-82

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Raamatus: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322

Tänuavaldused

Suured tänuavaldused juhendaja Leho Tedersoole. Tänan trühvliistanduse omanikku Karmo Kaldat. Sergei Põlmet ja Mohammad Bahramit abi eest seenekoosluse struktuuri analüüsil. Tänan ka oma vanemaid ning sõpru, kes olid toeks.

Summary

„Temporal dynamics of ectomycorrhizal fungi and persistence of *Tuber melanosporum* in inoculated *Quercus robur* seedlings in North Europe“

Eveli Otsing

Truffles (*Tuber* spp.) are fungi that form hypogeous ascocarps and establish ectomycorrhizal symbiosis with plant roots. Fruit-bodies of certain species such as *Tuber melanosporum* are highly appreciated as gourmet food. Natural distribution of *T. melanosporum* is geographically restricted to Southern and Western Europe including Italy, France and Spain. Climatic regions, where soils freeze in winter, are considered unsuitable for *T. melanosporum*. *T. melanosporum* is widely cultivated outside its natural habitat in various climatic conditions.

Members of the genus *Tuber* are heterotallic – fruit-body formation of truffles requires mating of two sexually compatible strains that possess different versions of a mating type-encoding locus *MAT*. Identifying *Tuber* spp. as well as other potential competitors and monitoring their dynamics in established plantations are important to comprehend the factors that influence survival and fructification.

This study aims to monitor the persistence of *T. melanosporum* in inoculated oak seedlings and document temporal changes of native ectomycorrhizal fungi in a 5-year-old Estonian plantation. We hypothesized that the inoculated *T. melanosporum* becomes scarcer and other ectomycorrhizal fungi become relatively more abundant and diverse along the temporal gradient after planting. We also aimed to determine the frequency of the two mating types.

The plantation of *T. melanosporum* was established in Saare county, Estonia in 2008. Sampling of ectomycorrhizal fungi was carried out in June-July, 2011–2013. In order to provide DNA-based identification of the inoculated truffle species and other co-occurring

ectomycorrhizal fungi, we amplified rDNA ITS region and to determine the presence of two mating types of *T. melanosporum*, we amplified genes in *MAT* locus.

The general ectomycorrhizal colonization level decreased within three years of observation. The relative abundance of *T. melanosporum* decreased, compared to other ectomycorrhizal fungi. In 2011, 2012 and 2013 it was 91.9%, 92.8% and 86.7%, respectively. Nevertheless, we detected *T. melanosporum* in each root sample analysed. Over three years, we recorded 19 species of ectomycorrhizal fungi on root tips of oak seedlings. Relative abundance and species richness of other ectomycorrhizal fungi slightly increased during the study period. We identified the genera *Hymenogaster* and *Hebeloma* to be the dominant ectomycorrhizal competing fungi in root systems. We detected the presence of two *MAT* idiomorphs (*MAT1-2* and *MAT1-1*) in the plantation. The idiomorph *MAT1-1* dominated, encompassing 75.0% of successfully amplified root tips.

The mycorrhiza of *T. melanosporum* proved resistant to cold winters and the fungus persisted well in the root systems of surviving seedlings albeit slight decline in relative colonization level over three years. Good vegetative growth of mycelia and the presence of two compatible mating types suggest that cultivation of *T. melanosporum* is possible in the nordic climate. Evaluation of fruit-body production will be a critical next step, because fruiting efficiency allows to determine economic feasibility and ecological sustainability of the Périgord truffle cultivation in northern habitats.

Lisa 1

Käsikiri

Ei kuulu elektrooniliselt avaldamisele.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Eveli Otsing (sünnikuupäev 12.07.1990),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Ektomükoriisete seente ajaline dünaamika ja liigi *Tuber melanosporum* püsimine hariliku tamme juurtel Põhja-Euroopas“, mille juhendaja on Leho Tedersoo,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 5.06.2014