

Tartu Ülikool

Loodus- ja tehnoloogiateaduskond

Ökoloogia ja Maateaduste Instituut

Mükoloogia õppetool

Mari Pent

SEENTE VILJAKEHADES ESINEVATE BAKTERITE FUNKTSIONAALNE JA
TAKSONOOMILINE MITMEKESISUS

Bakalaureusetöö

Juhendaja: teadur Kadri Põldmaa

Tartu 2013

Sisukord

1. Sissejuhatus	4
2. Lämmastikku siduvad bakterid seente viljakehades	7
2.1. Lämmastiku sidumine seenes <i>Tuber magnatum</i>	7
2.2. Lämmastiku sidumine seenes <i>Tuber borchii</i> Vittad.....	9
2.3. Lämmastiku sidumine austerserviku (<i>Pleurotus ostreatus</i>) ja perekonna <i>Bradyrhizobium</i> poolt moodustatud biofilmis.....	9
3. Seene viljakeha arengut ja mütseeli kasvu mõjutavad bakterid	10
3.1. Substraadi ja selle mikroobikoosluse mõju aedšampinjoni <i>Agaricus bisporus</i> viljakeha arengule.....	11
3.1.1. Pseudomonaadide mõju aedšampinjoni viljakeha arengule	12
3.1.2. Substraadi mõju aedšampinjoni viljakeha arengule	14
3.2. Bakterite võimalikud funktsioonid trühvliite küpsemisel	15
3.3. Seente <i>Pleurotus ostreatus</i> ja <i>Chroogomphus rutilus</i> kasvu mõjutavad bakterid.....	15
3.4. <i>Tuber borchii</i> eoskoti avanemist mõjutavad bakterid	17
4. Seenekasvatustes bakterhaigusi põhjustavad perekonna <i>Pseudomonas</i> esindajad.....	19
5. Seente viljakehi patogeenide eest kaitsevad bakterid.....	20
5.1. Bakterid tõrjuvad seentel esinevaid seenhaigusi	21
5.2. Aktinobakterite mõju sametpuravikel (perekond <i>Xerocomus</i>) esinevale parasiitsele seenele <i>Sepedonium microspermum</i> Bes I	22
5.3. Tolasiini detoksifitseerivad bakterid seltsi <i>Agaricales</i> esindajate viljakehades	22
6. Ektomükoriisaseente viljakehadega seotud bakterite taksonoomiline mitmekesisus.....	24
6.1. Bakterite taksonoomiline mitmekesisus trühvliite viljakehades	25
6.1.1. Hõimkonna <i>Proteobacteria</i> liikmed trühvliites.....	27
6.1.2. Hõimkonna <i>Bacteroidetes</i> esindajad trühvliites	28
6.1.3. Hõimkondade <i>Firmicutes</i> ja <i>Actinobacteria</i> liikmed trühvliites	29
7. Seentes teadaolevaid funktsioone täitvad bakterid ja nende spetsiifilisus	29
7.1. Perekonnad <i>Mycetocola</i> ja <i>Pedobacter</i>	30
7.2. Perekonnad <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i> ja Rhizobiumlaadsed bakterid	31
7.2.1. Perekond <i>Bradyrhizobium</i>	32
7.2.2. Perekond <i>Sinorhizobium</i>	33
7.2.3. Rhizoobiumilaadsed bakterid	33
7.3. Perekonnad <i>Pseudomonas</i> ja <i>Bacillus</i>	34
7.3.1. Perekond <i>Pseudomonas</i>	34
7.3.2. Perekond <i>Bacillus</i>	37
Arutelu.....	38

Kokkuvõte	42
Summary	44
Tänuavaldused.....	46
Kasutatud kirjandus.....	47
LISAD	52

1. Sissejuhatus

Baktereid on leitud kõikvõimalikest keskkondadest, nagu polaarjääd, kuumaveeallikad, mäetipud, ookeanipõhi, taimed, loomad ning metsamuld (<http://www.britannica.com>). Eelpool mainitud allikas on aga nimetamata, et baktereid on leitud ka seentest ja nende pinnalt, kuigi nendes keskkondades on veel vähe uuringuid läbi viidud. Olulisemaks on seni peetud uuringuid vees ja mullas ja eelkõige meditsiiniliste probleemide lahendamise eesmärgil.

Baktereid on leitud nii seente viljakehadest, sealhulgas seene rakkude seest ja rakkude vahelt, kui ka viljakehade pinnalt. Ka ümbritseva substraadi bakterikooslust on peetud oluliseks seente viljakeha küpsemisel ja spooride levimisel (Wang jt 2011; Noble jt 2009; Cho jt 2003a; Citterio jt 2001; Lumini jt 2006). Käesolev töö käsitleb kultiveeritavate seente viljakehadest ja nende pinnalt ning ümbritsevast substraadist leitud baktereid, välja arvatud endobaktereid. Endobaktereid on üldiselt leitud krohmseente (*Glomeromycota*) hulgast, nii arbuskulaarset mükoriisat moodustavatest liikidest, kui seenest *Geosiphon pyriforme*, aga ka ektomükoriisat moodustavatest kandseentest *Laccaria bicolor* ja *Tuber borchii*. Üheks näiteks endobakteri ja seene vahelisest sümbioosist on seos seene *Rhizopus* ja bakteri *Burkholderia* vahel, kus viimane toodab seene sees toksiini, mis on vajalik riisi idandite lehemädaniku arenemiseks (Lumini jt 2006).

Seente viljakehadest leitud bakteritega võrreldes on enam tähelepanu pööratud mükoriisa abistaja bakteritele (MHB-dele), kellel on mükoriisaseentes palju funktsioone. Taolised bakterid edendavad sümbioosi kujunemist taime ja seene vahel, stimuleerides mütseeli laienemist, suurendades juure ja seene vaheliste kontaktide arvu ja kolonisatsiooni ning vähendades kahjulike keskkonnatingimuste mõju mütseelile. Tänapäevaks tuvastatud MHB tüved kuuluvad paljudesse bakterirühmitustesse ja perekondadesse, nagu gram-negatiivsed proteobakterid (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* ja *Rhizobium*), gram-positiivsed bakterid hõimkonnast Firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus*, ja *Paenibacillus*) ja gram-positiivsed aktinomütseedid (*Rhodococcus*, *Streptomyces* ja *Arthrobacter*) (Frey-Klett jt 2007). Kuna viljakehad on mükoriisaseente üheks arenguvormiks, siis võib oletada, et nende bakterikooslused on üsna sarnased ja tihedalt seotud mükoriisadest tuvastatud bakteritega.

Lisaks elab seentes bakteriaalseid mükofaage, keda jaotatakse kolme põhitüüpi. Näiteks endotsellulaarseteks mükofaagideks võivad olla nii endosümbiondid kui vabalt elavad bakterid ja neid on leitud mükoriisaseentest, sealhulgas seenemattidest ja viljakehadest (Bonfante ja Anca 2009).

Käesoleva töö eesmärgiks on leida, milliseid baktereid leidub kultiveeritavate seente viljakehades ja viljakehi ümbritsevas substraadis ning millised on nende olulisemad funktsioonid. Püütakse välja selgitada millistest hõimkondadest ja millised bakterite perekonnad on seente viljakehades enim esindatud ning millest see võib tingitud olla. Samuti kirjeldatakse ja võrreldakse seente viljakehades kasvavate bakterite funktsionaalset mitmekesisust mõjutavaid tegureid. Bakterite taksonoomilist mitmekesisust võrreldakse kahel liigil trühvlite perekonnast *Tuber* ja neid tulemusi võrreldakse ka teiste seente viljakehadest tuvastatud bakterite mitmekesisusega. Eesmärgiks on selgitada välja kas ja millist mõju avaldab bakterikooslusele peremeesseene fülogeneetiline päritolu ja ökoloogia. Samuti käsitletakse põgusalt olulisemate seentest leitud bakteriperekondede iseloomulikke tunnuseid ja elupaiku, mida püütakse seostada seentes esinemisega. Püütakse uurida, et kui unikaalsed on leitavad interaktsioonid seente ja bakterite vahel ja selleks uuritakse seentest tuvastatud bakteriperekonna või liigi seoseid teiste organismidega ja samade funktsioonide täitmist teiste organismidega seoses.

Seened, mida siin töös on käsitletud, on kultiveeritavad seened austerservik (*Pleurotus ostreatus*), aedšampinjon (*Agaricus bisporus*), trühvlid (*Tuber magnatum* ja *Tuber borchii*) ja männiliimik (*Chroogomphus rutilus*). Männiliimikut on seni püütud tulutult kultiveerida. Austerservik *Pleurotus ostreatus* on üks maailmas kõige laiemalt kasvatatav seen, samas on kultiveeritava seenena populaarne ka aedšampinjon (*Agaricus bisporus*) (Cho jt 2003a). Kõik need seened on väärtuslikud söögiseened. Perekonna trühvel (*Tuber*) esindajad moodustavad söödavaid viljakehi, mis on hinnatud oma erilise lõhna ja maitse poolest ning neid võib pidada lausa delikatessiks (Mello jt 2006) Männiliimik võib olla oluline antibiootikumide ja teiste potentsiaalselt kasulike sekundaarsete ühendite tootja (Li jt 2009). Seega on tema võimalikult efektiivne kasvatamine peale toidu tootmise oluline veel näiteks ka meditsiinilisest seisukohast. On oletatud, et männiliimiku seni ebaefektiivne kasvatamine võibki olla tingitud sellest, et temaga seotud bakterite mitmekesisusest ja tähtsusest on veel vähe teada (Wang jt 2011). Ka teiste kultiveeritavate seente puhul võivad bakterikooslused väga olulised olla. Uurides nende funktsioone ja mõju peremeesseenele, on tõenäoliselt võimalik parandada mitmete kultiveeritavate seente

saagikust ja kvaliteeti. Samuti võivad biokontrollis osalevad bakterid, keda tuvastatakse seentes, osutada kasulikuks ka kultuurtaimede kasvatamisel ja patogeenide eest kaitsmisel (Tsukamoto jt 2002).

2. Lämmastikku siduvad bakterid seente viljakehades

Ühena seente viljakehades esinevate bakterite funktsioonidest on tuvastatud nende võime siduda lämmastikku (N₂). Seda täheldati Barbieri jt (2010a) poolt Itaalia valge trühvli (*Tuber magnatum* Pico.) puhul. Lämmastikku fikseerivaid baktereid on leitud ka *Tuber borchii* Vittad ja valge trühvli *T. magnatum* viljakehadest (Barbieri jt 2005a, 2007; Mello jt 2006). Trühvlid on ektomükoriisaseened (Mello jt 2006).

Ka austerserviku (*Pleurotus ostreatus*) puhul on tuvastatud lämmastiku sidumist, aga ainult juhul, kui seen on seotud perekonnast *Bradyrhizobium* pärinevate teatud bakteritüvedega. Viimaseid ei tuvastatud mitte viljakehadest, vaid nad moodustavad austerservikuga biofilmi (Jayasinghearachchi ja Seneviratne 2004).

Mitmed uuringud on leidnud, et potentsiaalselt lämmastikku siduvad bakterid on seotud ektomükoriisade ja arbuskulaarsete mükoriisadega (Barbieri jt 2010a). Kasutades molekulaarseid meetodeid on leitud lämmastiku fikseerimise võimet määrava nifH geeni olemasolu ja järjestus. Näiteks on nifH geeni leitud männi (*Pinus sylvestris*)-lehmataatiku (*Suillus bovinus*) ja *Pinus nigra*-liivtatiku (*Suillus variegatese*) (<http://elurikkus.ut.ee>) ektomükoriisadest (Frey-Klett jt 2007). Kuna lämmastik on taimede kasvu limiteeriv faktor ja on seega oluline nii põllumajanduse, aianduse kui ka metsanduse seisukohast, siis on selle sidumise võimalusi üsna palju uuritud (Frey-Klett 2007a). Energiavajaduse lämmastiku fikseerimiseks täidab ATP. Kui fosfor on defitsiidis, siis on ka fosforit sisaldava ATP hulk nitrogenaasse aktiivsuse jaoks limiteeritud. Ektomükoriisid seened võivad seega olla eriti olulised lämmastikku siduvate bakterite fosforiga varustamisel, kuna erinevalt enamikest organismidest suudavad mükoriisaseened omastada fosforit inertsetest mullafosfaatidest (Li ja Hung 1987).

Alljärgnevatel alapeatükkides on käsitletud seeneliike, kelle viljakehadest või teatud bakteriga moodustunud biofilmist on leitud lämmastikku siduvaid baktereid.

2.1. Lämmastiku sidumine seenes *Tuber magnatum*

Tuber magnatum on maa-alune kottseen, kes elab sümbioosis peremeestaime juurtega, et läbida elutsükli kõik etapid. See hõlmab kasvu esimest faasi vabaltelava mütseelina, teise faasina sümbiootilist seost paljas- või katteseemnetaimede juurtega ektomükoriisa näol, misjärel moodustuvad lõpuks maa-alused viljakehad, milles eoskottides valmivad

kotteosed. Seene *T. magnatum* viljakehad suudavad mullas kasvada ka olles seotud väga väikese hulga mükoriisadega, mis võiksid üldiselt viljakehade arengule kaasa aidata. Lisaks on otsesed seosed maa-aluste mütseelide, mükoriisade ja viljakehade vahel ka üldiselt puudulikud. Nende eelnimetatud tingimuste tõttu võibki toitainete parem kättesaadavus lämmastikku fikseerivate bakterite abil anda kasuliku efekti viljakeha arengule ja küpsemisele. Selleks, et teha kindlaks, kas liigiga *T. magnatum* seotud bakterid sisaldavad lämmastiku fikseerimise geene, määrati neil nifH geenide järjestused, mis kodeerisid nitrogenaasi Fe valgu alaühikut (Barbieri jt 2010a).

Lämmastiku sidumise kindlaks määramiseks seenes *Tuber magnatum* kasutati nitrogenaasi geeni ekspressiooni detekteerimist. Nitrogenaasi geeni (nifH) amplifitseerimiseks liigi *T. magnatum* viljakehas ja seene erinevatel küpsustasemetel kasutati PCR-i (polümeraasi ahelreaktsiooni) degenereerunud praimereid (Barbieri jt 2010a). Aminohapete järjestused näitasid, et tuvastatud liigid kuuluvad peamiselt alfaproteobakterite klassi, perekonda *Bradyrhizobium*. Kõige olulisem sarnasus leiti liigiga *Bradyrhizobium elkanii* (74,5%, 380 kloni 510-st kloonist) ja väike osa kloonidest sarnanesid enim perekonna *Sinorhizobium* liikidega (3,92%, 510-st kloonist 20). Liigi *B. elkanii* OTU (operatsiooniline taksonoomiline ühik) oli esindatud igas analüüsitud viljakehas (Barbieri jt 2007). *Bradyrhizobium elkanii* oli varasemalt kirjeldatud kui tavaline sojaoa nakataja, mis on võimeline atmosfäärist lämmastikku fikseerima sümbiootilistes suhetes liblikõieliste taimedega (Rumjanek jt 1993). Nendel liikidel tuvastati ka nifH geenide ekspressioon. Atsetüleeni vähenemise katses hinnatud nitrogenaasi aktiivsus osutus sarnaseks liblikõieliste taimede varastes noodulites esinevatel spetsiifilistel lämmastikku fikseerivate bakteritel tuvastatuga. See oli esimene nitrogenaasi geeni ekspressiooni ja aktiivsuse demonstratsioon trühvliis. Kõikidel analüüsitud trühvliitel tuvastati nitrogenaaset aktiivsust (Barbieri jt 2010a).

nifH mRNA amplifikatsiooni abil on ka näidatud, et perekonna *Bradyrhizobium* liikidega suguluses olevad bakterid ja klassi *Epsilonproteobacteria* ja hõimkonda *Firmicutes* kuuluvad bakterid, olid võimelised aktiivselt lämmastikku fikseerima (Barbieri jt 2010a).

Märkimisväärseid tõendeid mikroobikoosluse ajalisest arengust ektomükoriisade moodustamise ja viljakehade tootmise käigus trühvliitel ei ole leitud. Siiski on selgitatud, et potentsiaalsed lämmastikku fikseerivad bakterid ilmnevad alati trühvliite viljakehades,

hoolimata nende küpsusastmest. Seega potentsiaalsed lämmastikku fikseerivad bakterid võivad mängida olulist rolli trühvli viljakeha arengus ja küpsemises (Barbieri jt 2007).

Mitmekesisuse uuringutes on seenes *Tuber magnatum* leitud konstantne ja märkimisväärne α -proteobakterite arvukus, kelle hulgas on peamised perekondade *Sinorhizobium/Ensifer*, *Rhizobium/Agrobacterium* ja *Bradyrhizobium* liigid. α -proteobakterite esinemist seoses seenega *T. magnatum* viljakehadega, sõltumata nende küpsuse astmest, oli kinnitatud ka kvantitatiivse FISH uuringuga (Barbieri jt 2007).

2.2. Lämmastiku sidumine seenes *Tuber borchii* Vittad.

Seenest *Tuber borchii* on puhaskultuuri kasvama viidud samuti α -proteobakterite tüvesid, kasutades mannitooli söödet, mis on spetsiifiline perekonna *Rhizobium*-laadsetele bakteritele. *Sinorhizobium*, *Rhizobium* ja *Bradyrhizobium* on hästi tuntud oma võime tõttu kasvada sümbioosis liblikõieliste taimedega, kus nad vastutavad aktiivse lämmastiku sidumise eest juurenoodulites. Ektomükoriisaseente viljakehadest (erinevad *Tuber* liigid) on leitud mitmeid vabaltelavaid *Rhizobium*-laadseid tüvesid ja teisi lämmastikku siduvaid baktereid. Seenest *T. borchii* Vittad. leiti esmakordselt α -proteobaktereid, kui kasutati klooniraamatukogusid. Kloonidest 97% sarnanesid perekondadest *Sinorhizobium/Ensifer*, *Rhizobium* ja *Bradyrhizobium* pärit liikidega. Varem ei olnud neid perekonnas *Tuber* tuvastatud. Need bakteriperekonnad võivad aga omada olulist rolli seenega kasvus või toitumises viljakeha arengu vältel. (Barbieri jt 2005a).

2.3. Lämmastiku sidumine austerserviku (*Pleurotus ostreatus*) ja perekonna *Bradyrhizobium* poolt moodustatud biofilmis

Tuvastatud on lämmastiku sidumine seeneperekonna *Pleurotus* ja teatud bakterite poolt moodustatud biofilmis. Nitrogeenasne aktiivsus oli olemas biofilmis, kuid puudus seenega ja lämmastikku siduva bakteri eraldi kasvamisel. Jayasinghearachchi ja Seneviratne (2004) hindasid *in vitro* uuringus biofilmi moodustumise võimalust ja lämmastiku fikseerimist seenega *P. ostreatus* ja tavaliselt sojaoal noduleeruva *Bradyrhizobium* tüve vahelises seoses. Uuritud biofilmis tuvastati mütseeli kaalu langus võrreldes kontrollidega, kus seenega *P. ostreatus* mütseelile ei lisatud perekonna *Bradyrhizobium* tüvesid. Kaalu langus võib olla tingitud süsiniku ülekandmisest seenelt lämmastikku siduvale bakterile, kuna süsiniku kulu bioloogilisel lämmastiku sidumisel on suur. Igal juhul oli kuivkaalu vähenemine mütseelis märkimisväärne, ca. 50%, ja samal ajal leiti märkimisväärne lämmastiku kontsentratsiooni

kasv, ca. 150%. Uuringust selgus, et seened üksi ei suuda fikseerida atmosfäärilist lämmastikku, aga kui nad on seotud lämmastikku siduvate bakteritega, on nitrogeenaasne aktiivsus tuvastatav. Seega kuigi seen ise ei fikseeri lämmastikku, võivad efektiivsed lämmastiku fikseerimise süsteemid suurendada seente valgu sisaldust (Jayasinghearachchi ja Seneviratne 2004).

Austerserviku *P. ostreatus* viljakehade pinnalt on puhaskultuuri eraldatud ka lämmastikku fikseerivat bakterit *Pseudomonas fluorescens*. Viimase toimel täheldati samuti primordiumi moodustumist ja basidiokarpide arengu edenemist (Cho jt 2003a).

3. Seene viljakeha arengut ja mütseeli kasvu mõjutavad bakterid

Teise funktsioonina on tuvastatud bakterite mõju seente viljakehade arengule. Ka lämmastiku sidumisel on tõenäoliselt oluline roll seene viljakehade arengus ja neid funktsioone ei saa seetõttu täielikult lahutada. Noble jt (2009) näitasid seene kasvukeskkonnas leiduvate pseudomonaadide mõju aedšampinjoni noorte viljakehade moodustumisele. Pseudomonaadid kõrvaldavad õhust lenduvaid orgaanilisi komponente (VOC-e), mis inhibeerivad primordiumi moodustumist. Üldiselt on näidatud, et bakterid tarbivad aedšampinjoni vegetatiivse mütseeli poolt toodetud lenduvat ja seene kasvu inhibeerivat 1-okteen-3-ooli. Leitud on ka orgaanilise ja anorgaanilise fosfori lahustamist ja siderofooride tootmist bakterite poolt, mis muudavad raua kättesaadavust ja mille abil on seega võimalik läbi viia patogeene biokontrolli (Zaranejad jt 2012). Mõned bakterid võivad mõjutada ka eoskoti avanemist, mida on täheldatud näiteks ektomükoriisaseenel *Tuber borchii* Vittad. (Barbieri jt 2005a). Mõju viljakeha arengule ja küpsemisele on tuvastatud ka trühvli *Tuber magnatum* puhul (Barbieri jt 2007). Lisaks ektomükoriisa moodustamise soodustamisele on teada, et mõned bakterid mõjutavad viljakehade moodustumist saproobsetel või patogeensetel seentel, näiteks *Fomitopsis pinicola* (kännupess), *Fomes fomentarius* (tuletael), *Echinodontium tinctorium* ja *Agaricus bisporus* (Larsen jt 1978; Barbieri jt 2007) (<http://elurikkus.ut.ee>). Sbrana jt (2002a) näitasid, et *Tuber borchii* mütseeli kasvu mõjutavad ektomükoriisaga seotud bakterid. Järgnevates alapeatükkides on mõningate seni läbiviidud uuringute põhjal kirjeldatud seentes esinevate bakterite mõju viljakehade arengule ja askuse avanemisele.

Mõnede kultiveeritavate seente puhul ei ole baktereid, kes edendavad seente arengut, viljakehadest leitud. Siiski on oluline käsitleda nende majanduslikult oluliste seente puhul ka kompostis ja substraadis esinevate bakterite mõju. Enamasti mõjutavad substraadis leiduvad bakterid samuti viljakeha arengut. Mikroorganismid, keda on leitud seene kasvusubstraadist, on eriti olulised viljakeha moodustumise algatamisel (Cho jt 2008). Eriti hästi on teada, et seene *Agaricus bisporus* kasv ja areng on mõjutatud perekonda *Pseudomonas* kuuluvate fluorestseeruvate bakterite pool (Noble jt 2009a). Samuti on aedšampinjoni (*Agaricus bisporus*) kasv ja areng mõjutatud substraadis esinevate bakteriperekondade *Acinetobacter* ja *Bacillus* poolt. Ka kasvukeskkonna üldised omadused mõjutavad näiteks veemahtuvusvõime ja elektrijuhtivus (Choudhary jt 2009). Cho jt (2008a) katsed näitasid, et baktereid on leitud ka austerserviku *Pleurotus ostreatus* kasvumatti ümbritsevast mullast. Need bakterid on olulised nii primordiumi moodustumisel kui seene viljakeha arengus (Cho jt 2008a). Austerserviku mütseeli pinnalt leiti ka baktereid, kes osalevad viljakehade tekke algatamisel (Cho jt 2003a). Männiliimiku (*Chroogomphus rutilus*) puhul, mis on samuti söödav seen, on leitud substraadist perekondade *Bacillus* ja *Pseudomonas* esindajaid (Wang jt 2011). On oletatud, et perekonna *Pseudomonas* liikide ja männiliimiku vaheline interaktsioon võib olla võtmekohaks seene kasvatamisel väljaspool looduslikke kasvukohti (Wang jt 2011).

3.1. Substraadi ja selle mikroobikoosluse mõju aedšampinjoni *Agaricus bisporus* viljakeha arengule

Liigi *Agaricus bisporus* primordiumi (noore viljakeha) moodustumine sõltub viljakeha ümbritsevas substraadis sisalduvatest stimulaatorsetest bakteritest ja nagu mitmes uuringus (Noble jt 2009a; Zaranejad jt 2012) näidatud, eriti pseudomonaadidest. Teistest teguritest on oluline piisav õhuvahetus (Noble jt 2009a).

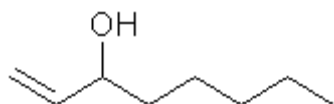
Substraadi mikroobikoosluses leiduvate bakterite mõju saagikusele on leitud ka aedšampinjoniga samast perekonnast pärineva liigi *Agaricus bitorquis* (linnašampinjon) puhul. Sealt on leitud saagikust suurendavaid baktereid, kellega nakatati substraati. Nendeks bakteriteks olid *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus circulans-II* ja *Bacillus thuringensis*. Samas kõiki neid baktereid ei ole leitud seene *Agaricus bisporus* saaki suurendavatena. Seda võib seletada asjaolu, aedšampinjon on madalama temperatuuri nõudlusega kui linnašampinjon, mis näitab, et see temperatuur ei pruugi nendele bakteriliikidele paljunemiskes sobiv olla ja seetõttu nad ei ela aedšampinjoni substraadis

(Ahlawat ja Rai 2000). Seega võib temperatuur olla üsna oluline substraadi bakterikoosluse määramisel ja sellest võivad olla tingitud isegi sama seeneperekonna eri liikidega seotud bakterikoosluste erinevused.

3.1.1. Pseudomonaadide mõju aedšampinjoni viljakeha arengule

Viljakeha moodustumine on kasvu üleminek vegetatiivsest faasist reproduktiivsesse faasi, mis aedšampinjoni kasvatamisel sõltub eriliste füüsikaliste, keemiliste ja mikrobioloogiliste omadustega substraadi olemasolust. Faasi muutus saavutatakse praktiliste keskkonna manipulatsioonidega ja looduslike bakterite, nagu *Pseudomonas putida*, lisamisega, nagu on väidetud hiljutises Zarenejad jt (2012) poolt läbi viidud uuringus. On leitud, et umbes 97% seentest isoleeritud tüvedest on võimelised kasvama lenduva orgaanilise ühendi (VOC) 1-okteen-3-ooli (vt Joonis 1.) olemasolul ja 36% olid võimelised lahustama fosforit. 1-okteen-3-ool mängib olulist rolli seene enda poolt toodetud inhibiitorina väga kõrgete eoste tiheduse juures (Zarenejad jt 2012).

Liigi *Agaricus bisporus* mütseeli poolt toodetud VOC ühendite hulgas on ülekaalus C8 komponendid, millest kõige inhibitoorsem on 1-okteen-3-ool. Leitud on ka 2-etüül-1-heksanooli inhibeeriv toime seene *Agaricus bisporus* primordiumi moodustumisele (Noble jt 2009a). 2-etüül-1-heksanooli ja 1-okteen-3-ooli olemasoluga mikrokeskkonnas kaasnes bakterite koguhulga ja pseudomonaadide populatsioonide suurenemine substraadis (Noble jt 2009a). Zarenejad jt (2012) näitasid samuti perekonna *Pseudomonas* hulga kasvu ümbritsevas substraadis seene saagi tootmise käigus. Liigi *Agaricus bisporus* mütseeli arenemisel substraadis kasvas sealne pseudomonaadide populatsioon 7.5×10^5 cfu-st grammi kohta 8.1×10^5 cfu-ni grammi kohta, olles 1.2×10^4 cfu grammi kohta aedšampinjoni *Agaricus bisporus* puudumisel. See näitab veelkord, et *Agaricus bisporus* ilmselt toodab ühendeid, mida pseudomonaadid kasutavad (Noble jt 2009a).



Joonis 1. 1-okteen-3-ool. Seene mütseeli poolt toodetav ühend, mis inhibeerib viljakehade moodustumist. Pseudomonaadid ilmselt võimelised antud ühendit metaboliseerima ja aitama sellega kaasa viljakeha arengule (<http://www.leffingwell.com/alkenol.htm>).

Aedšampinjoni viljakeha moodustumine algab seeneniidistiku koondumisega paksudesse kiududesse, järgneb primordiumi moodustumine, millest arenevad edasi viljakehad. Noore viljakeha moodustumiseks on vajalik stimuleerivate bakterite, *Pseudomonas putida*, olemasolu. Aktiveeritud süsi ja teised adsorbentsed materjalid võivad asendada stimulaatorseid pseudomonaade, kuna nad ilmselt adsorbeerivad komponente, mis inhibeerivad primordiumi moodustumist ja mida muidu metaboliseerivad pseudomonaadid. Substraadi ja tema mikrobiota ning õhuvahetuse stimuleerivad efektid liigi *Agaricus bisporus* primordiumi moodustumisele on vähemalt osaliselt tingitud mütseeli ja selle substraadi poolt toodetud inhibitoorsete C8 komponentide vähenemisest (Noble jt 2009a).

Ka hiljutises Zaranejad jt (2012) uuringus on leitud, et inhibiitorkomponentide metaboliseerimisest, seene *Agaricus bisporus* substraadis, võib tuleneda pseudomonaadide populatsiooni kasv seene arengu vältel. Nakatamine bakteriperekonna *Pseudomonas* kasulike tüvedega suurendab aedšampinjoni saaki kuni 14%-i ja see on oluline tööstusliku tootmise seisukohast. Seega 1-okteen-3-ooli tarbimine *Pseudomonas putida* poolt võib olla efektiivne seene saagikuse suurendamiseks (Zaranejad jt 2012).

Hiljuti on leitud, et 1-aminotsüklopropan-1-karboksüülhape (ACC) deaminaasi (AcdS-i) tootev bakteriaalne tüvi *Pseudomonas putida* UW4 võib kultuuris koos seenega *Agaricus bisporus* kasvades kinnituda selle hüüfidele, edendada hüüfide kasvu ja vähendada aedšampinjoni etüleeni tootmist. Kui seda tüve on lisatud steriliseeritud substraadile, siis soodustab see noorte viljakehade moodustumist. Võrdlusena AcdS-defitsiitne mutant, UW4-AcdS⁻, tekitab vastupidise efekti. AcdS-i tootvad bakterid lagundavad ACC-d, alandavad etüleeni taset seene hüüfis ja vähendavad etüleeni inhibitsiooni. *A. bisporus* toodab ise ACC-d ja etüleeni ja kuna ACC edendab etüleeni tootmist, siis aitabki selle lagundamine bakteri poolt kaasa etüleeni taseme vähendamisele. Need tulemused näitasid, et aedšampinjoni primordiumi moodustumise inhibiitoriks on etüleen (Chen jt 2013).

Samuti on leitud, et primordiumi moodustumist võivad perekonna *Pseudomonas* mõned tüved mõjutada kaudselt ka tänu edukale konkurentsile patogeensete või kahjulike bakteritega Fe³⁺ pärast. Lisaks on ka olulisi elemente ja mikroelemente, mis on vajalikud seene *Agaricus bisporus* kasvuks (Zaranejad jt 2012). Mõned pseudomonaadid võivad orgaanilisi happeid tootes lahustada anorgaanilist fosfaati, mis on samuti seentele vajalik. Orgaanilised happed, mida bakterid toodavad, võivad muuta mikroelemendid seentele kättesaadavaks ja see omakorda võib suurendada seene saagikust (Zaranejad jt 2012).

3.1.2. Substraadi mõju aedšampinjoni viljakeha arengule

Seen *Agaricus bisporus* vajab täis elutsükli läbimiseks kahte erinevat substraati. Üheks on kompost, mida on vaja toitumiseks ja kus seen kasvab vegetatiivselt, ja teiseks on toitainete- vaene substraat, kus on sobivad füsiokeemilised/bioloogilised tingimused, mis stimuleerivad primordiumite moodustumist viljakeha moodustumise alguses. Seega on substraadil oluline roll šampinjoni saagikuse määramisel (Choudhary jt 2009).

Arvatakse, et aedšampinjoni *Agaricus bisporus* (Lange) kasvatamisel käivitab toitainevaese substraadi lisamine viljakehade moodustumise. Sellele aitavad kaasa ka ümbritsevas kasvukeskkonnas elavad bakterid. Substraadi toitainete hulga muutus on tugevalt korreleeruv sealse mikroflooraga. Kahes erinevas kasvusubstraadis, farmisõnnik koos ammendatud seenesubstraadiga (FYM+SMS, 3:1) ja farmisõnnik koos Vermikompostiga (FYM+VC, 3:1), täheldati γ -proteobakterite, perekondade *Acinetobacter* ja *Pseudomonas*, suurt mitmekesisust. Gram-positiivsete bakterite hulgas oli kõige rohkem esindajaid perekonnast *Bacillus* (Choudhary jt 2009).

Fülogeneetilised analüüsid näitasid, et aedšampinjoni substraadist leitud isolaatidest kuulusid 85%-i γ -proteobakterite gruppi ja ülejäänud olid batsillid. Üks isolaat selles uuringus kuulus perekonda *Sphingobacterium*. Ülekaalus olid perekonnad *Acinetobacter* ja *Pseudomonas* ja nemad olidki esindajad γ -proteobakterite hulgast. Perekonna *Acinetobacter* dominantus oli oluline, kuna seda ei ole seent ümbritsevast ökosüsteemist varem leitud (Choudhary jt 2009).

Substraadis esindatud bakterid mõjutavad seene *Agaricus bisporus* kasvu ja morfogeneesi. Substraat on sobiv kasulike mikroobide populatsioonidele, kes vabastavad kasvu stimuleerivaid aineid, mis on arvatavasti samuti kaasatud viljakehade teke algatamise (Choudhary jt 2009). Kui substraat on rikas orgaanilise materjali poolest, on tõenäoline, et see häirib komposti selektiivsust ja jätkub seene vegetatiivne kasv ning seetõttu on takistatud viljakehade teke. Iseloomulikult põhjustavad mikroorganismid ka füüsilisi ja keemilisi muutusi oma elupaigas. Veemahtuvusvõime näib otseselt olevat sõltuv poorsusest ja lasuvustihedusest. Need faktorid omakorda on otseselt mõjutatud mikroobsest kooslusest. Leitud on, et kõrgem elektrijuhtivus tingib FYM+VC keskkonnas madalama saagi. Tulemused näitavad, et substraadi elektrijuhtivus mängib olulist rolli šampinjoni tootmises, aga see ei ole ainus kontrollfaktor. Süsiniku/lämmastiku osakaal mõjutab samuti otseselt seene saagikust (Choudhary jt 2009).

3.2. Bakterite võimalikud funktsioonid trühvlite küpsemisel

Trühvli küpsemisprotsess sisaldab spooride moodustumist ja lenduvate komponentide tootmist, mis iseloomustavad trühvli tüüpilist aroomi. Trühvleid uuriti küpsemise erinevates etappides, mis viib lõpuks spooride moodustumiseni (Barbieri jt 2007). Bakterite võime modifitseerida toitaineid aineriinge käigus kättesaadavateks, on trühvlite jaoks oluline, kuna trühvlite viljakehad muutuvad pärast primordiumi moodustumist sõltumatuks peremeestaimest ja seetõttu vajavad nad bakterite poolt kättesaadavaks muudetud toitaineid, et lõpetada küpsemisprotsess (Barbieri jt 2010a; Barbieri jt 2007).

3.3. Seente *Pleurotus ostreatus* ja *Chroogomphus rutilus* kasvu mõjutavad bakterid

Kultiveeritava austerserviku *Pleurotus ostreatus* ümbritsevast kasvusubstraadist on isoleeritud väga erinevaid baktereid. Substraat on kiht, millega kaetakse komposti pind ja selle rolli uuriti söödava seene *P. ostreatus* viljakeha induktsioonil. Lahtises pinnases oli esialgu ülekaalus perekond *Bordetella*, samal ajal perekond *Flavobacterium* oli ülekaalus pärast substraadi steriliseerimist. Fluorestseeruvate bakterite perekond *Pseudomonas* oli ülekaalus mittesteriliseeritud substraadis. Bakteriperekondade koguarv substraadis oli kõrgem kui lahtises pinnases. Eriti oli täheldatud fluorestseeruva perekonna *Pseudomonas* kasvu mittesteriliseeritud substraadis, millega kaasnes viljakeha induktsioon, suurenes seene saak ja ka aktinomütseetide populatsioonid kasvasid. Tulemused näitavad, et substraadis esinevad spetsiifilised bakteripopulatsioonid mängivad olulist rolli primordiumi moodustumises ja viljakeha arengus (Cho jt 2008a).

Cho jt (2008a) kirjeldasid, et austerserviku mütseeli kasv edenes ümbritseva substraadi olemasolul ja viljakeha moodustumise periood lühenes. Kuna fluorestseeruv *Pseudomonas* edendab seene *Pleurotus ostreatus* kasvu, võib tema tiheduse kasv olla seotud viljakeha moodustumisega. Ka Cho jt (2003a) eksperiment näitas, et mütseeli puhaskultuuride nakatamisega fluorestseeruvate perekonna *Pseudomonas* liikidega, on võimalik edendada primordiumi moodustumist ja tõhustada seene *P. ostreatus* viljakeha arengut. On järeldatud, et mütseeli nakatamine spetsiifiliste bakteritega võib olla kasulik rakendus seente tootmiseks (Cho jt 2003a).

Nakatamine fluorestseeruvate perekonna *Pseudomonas* liikidega edendas märkimisväärselt seene *Pleurotus ostreatus* mütseeli arengut, primordiumi moodustumist ja viljakeha

arengut (Cho jt 2003a). Selleks, et jälgida nakatamise mõju seene *Pleurotus ostreatus* kasvule, oli kasutatud vegetatiivset söödet ja toitainetevaest söödet. Kui bakterid *Pseudomonas* liigid olid viidud toitainetevaesesse ja vegetatiivsesse söötmesse, siis mütseel, mis kasvas nakatamiskoha ümbruses, omas tihedat kasvu ja hästi arenenud viljakehi. Kui aga nakatamist ei toimunud, oli viljakehade areng puudulik. Enamik fluorestseeruvate pseudomonaadide kolooniatest olid 16S rDNA järjestuste alusel 99% sarnased liigiga *Pseudomonas putida* (Cho jt 2003a).

Kasutades 16S rRNA geenijärjestuste analüüsi, olid tuvastatud kahte monofüleetilise klastrisse jagatud bakteriisolaadid ka männiliimiku (*Chroogomphus rutilus*) viljakehi ümbritsevast mullast. Need klastrid sarnanesid märkimisväärselt samuti perekondadega *Bacillus* ja *Pseudomonas*. Umbes 80% isolaatidest olid perekonna *Bacillus* liigid (Wang jt 2011).

Wang jt (2011) poolt läbi viidud uuringus 16S rRNA järjestuste alusel leiti, et 17 perekonna *Bacillus* isolaati moodustasid 3 klastrit. Klaster I sisaldas 8 isolaati, millest viis tüve olid rohkem kui 99.9% sarnased liigiga *Bacillus simplex*. 3 tüve sarnanesid 99.9% perekonna *Bacillus* liigiga LMG 20238. Klaster II sisaldab kahte tüve, mis olid 99.9% sarnased liigiga *Bacillus aryabhatai*. Klaster III sisaldab seitset tüve. Kuus neist klasterdusid liigiga *B. thuringensis*, sarnasustega rohkem kui 99.9%. Üks tüvi näitas olulisimat sarnasust, nimelt 99.9%, liigiga *Bacillus cereus* (Wang jt 2011).

Seent *Chroogomphus rutilus* ümbritsevast mullaproovist tuvastati ka neli perekonna *Pseudomonas* liiki. On näidatud, et saprotroofsete bakterite, nagu *Pseudomonas*, olemasolu ümbritsevas substraadis võib edendada viljakeha moodustumist. Pealegi võivad perekonna *Pseudomonas* poolt eritatud sekundaarsed produktid, nagu insektitsiidid ja germitsiidid, mõjutada seene *Chroogomphus rutilus* mütseeli kasvu looduslikus elupaigas. Perekonna *Pseudomonas* liike peetakse üldiselt tavalisteks taimekasvu edendavateks risobakteriteks (PGPR). See seletab *Pseudomonas* liikide isolatsiooni mullaproovidest. Perekonna *Pseudomonas* isolaatidest 4 tüve klasterdusid liigiga *Pseudomonas koreensis*. Teises klastris sarnanes üks tüvi liigiga *Pseudomonas umsongensis* (Wang jt 2011).

Üksikasjalikud uuringud interaktsioonide kohta söödavate seente ja bakterite vahel on läbi viidud peamiselt liigi *Pseudomonas putida* tüvedega. See liik algatab basidioomi moodustumise ja stimuleerib seene kasvu (Cho jt 2003a). Pseudomonaadide mõju seenele *Pleurotus ostreatus* ei ole veel nii palju uuritud, küll aga on tuvastatud bakterid olemasolul

seene *Agaricus bisporus* hüüfide pikenemine ja noorte viljakehade moodustumine (Noble jt 2009a; Zaranejad jt 2012). Leitud on, et kõrge saagikus oli seotud kõrgemate pseudomonaadide populatsiooni tihedustega, nii komposteeritud kui mittekomposteeritud keskkonnas (Cho jt 2003a).

Cho jt (2003) uuringu tulemused näitasid, et kõigi kultuuri viidavate bakterite, sealhulgas pseudomonaadide, populatsioonide suurused olid umbes 10 korda kõrgemad komposteeritud söötmes, kui võrrelda mittekomposteeritud söötmega. See võib seletada mittekomposteeritud söötme võimetust anda mitut järjestikust seenesaaki, kuna tselluloos-ligniini kompleksiga seotud raskesti kättesaadav süsinik ei võimalda rikkalikku kasvu pärast seda, kui kergesti kasutatav süsinik on ära kulutatud esimese saagi tarbeks. Bakterite olemasolul võivad nad aga kaasa aidata raskesti kättesaadava süsiniku vabastamisele (Cho jt 2003a).

Samal ajal kui lahtises pinnases on kõrge β - ja γ -proteobakterite tihedus, näitasid uuringud, et steriliseeritud substraadis on CFB (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*) grupi bakterid ja β -proteobakterid ülekaalus, sarnaselt mittesteriliseeritud substraadiga, kus on ülekaalus CFB grupi bakterid ja γ -proteobakterid. Vastavalt bakterite mitmekesisusele saab substraati lugeda heaks materjaliks seene *P. ostreatus* kasvu edendamisel, samuti kompostimist, mis on väga oluline, et suurendada nii seene *P. ostreatus* kui seene *Agaricus bisporus* saagikust (Cho jt 2008a). Ka seene *Chroogomphus rutilus* puhul on tõendamist leidnud kompostimise tähtsus (Wang jt 2011).

3.4. *Tuber borchii* eoskoti avanemist mõjutavad bakterid

Liigi *Tuber borchii* mikroobikoosluste uuringud on leidnud pseudomonaade, aeroobseid ja spoore moodustavaid baktereid ning aktinomütseete seene *Tuber borchii* ektomükoriisadest või viljakehadest (Barbieri 2010a; Sbrana jt 2002a). Nimelt on teatud pseudomonaadid ja batsillid *Tuber borchii* viljakehades, kes omavad selget kitinolüütilist aktiivsust ja on eeldatavalt võimelised mõjutama askospori idanemist, hõlbustades askuse avanemist. Pseudomonaadide proteolüütiline ja kitinolüütiline aktiivsus avastati esialgu kukeseene (*Cantharellus cibarius*) viljakehadest (Barbieri jt 2005a).

Eelnevad uuringud varastel küpsustasemetel *Tuber borchii* viljakehadest, näitasid bakterite rolli sporokarbi struktuurasetes muutustes. Selleks, et kontrollida seda hüpoteesi, uurisid Citterio jt (2001) mikroobsete ja ultrastrukuraalsete meetodite abil *Tuber borchii*

sporokarpide bakteriaalset kooslust *Tuber borchii* erinevates küpsemise etappides. Erilist tähelepanu pöörati kitinolüütilistele ja tsellulolüütilistele bakteritele ja nende suhetele askuste ja askosporidega. Leiti, et *Pseudomonas fluorescens* ja spoore moodustav gram-positiivsete bakterite sugukond *Bacillaceae*, kes mõlemad on võimelised lagundama tselluloosi ja kitiini, esinevad viljakehades kõigi uuritud küpsustasemetel puhul. Kogu mikroobipopulatsioon oli progresseeruvalt kasvav ja seda seene kesktaaseme küpsusfaasist edasijõudnud lagunemise faasideni. Seega näib, et sporokarp võib mõjutada bakterite kasvudünaamikaid, eriti biokeemilisi protsesse, mis toimuvad sporokarbi lagunemise käigus (nt. pH tõus ammooniumi lagunemise tõttu kitiini lagunemise käigus) ja muudavad arvatavasti keskkonnatingimused viljakehades väga selektiivseteks. Enamus liigi *Pseudomonas fluorescens* tüvedest ja sugukonna *Bacillaceae* liikmetest on võimelised lagundama tselluloosi. Tsellulolüütilist võimekust näitasid 64% liigist *Pseudomonas fluorescens* ja 59% sugukonnast *Bacillaceae*. Samas leiti ka, et enamus nendest bakteritüvedest omasid kitinolüütilist aktiivsust. Liigist *Pseudomonas fluorescens* pärinevatest bakteritest omasid 55% kitinolüütilist aktiivsust ja sugukonnast *Bacillaceae* pärinevatest tüvedest 64%. Bakterite rühmad paiknesid enamasti hüüfisiseses ruumis, tihti askuse seinale lähedal ja edasijõudnud lagunemise faasides askuse sees. (Citterio jt 2001).

Pealegi, pulgakujulised bakterid on võimelised uuristama askuse seinu ja koloniseerima askuste sisemust, mis sisaldab küpseid spoore. Need omadused viitavad nende bakterite võimalikule rollile askuse avanemise protsessis. Liigi *Pseudomonas fluorescens* ja sugukonna *Bacillaceae* isoleerimine küpsetest spooridest ka pärast puhastamist lahusega, mis sisaldas SDS-i deioniseeritud vees ja klooramiin-T-d, näitab tihedat seost bakterite ja askosporide vahel (Citterio jt 2001).

Liigi *Pseudomonas fluorescens* ja sugukonna *Bacillaceae* võime lagundada kitiini, mis on hüüfiseinte põhikomponent ja paljude pulgakujuliste bakterite võime uuristada askuste seinu, näitab nende bakterite rolli askuse avanemise protsessis ja järelkult ka spooride levimises (Citterio jt 2001).

4. Seenekasvatustes bakterhaigusi põhjustavad perekonna *Pseudomonas* esindajad

Patogeensed bakterid on tihti seotud seene viljakehadega, põhjustades pruunplekkhaiguse (ingl. k. brown blotch disease) sümptomeid. Seda haigust põhjustab peamiselt liik *Pseudomonas tolaasii* või vahetevahel liik „*Pseudomonas reactans*“. Uue pruunplekkhaiguse põhjustajana on leitud bakter *Pseudomonas costantini*. Algselt isoleeriti see bakter Soome seenekasvatustest ja ta täitis kaks iseloomulikku kriteeriumit *Pseudomonas tolaasii* infektsiooni diagnoosiks, sealhulgas saadi tüüpiline pruunipleki sümptom *Agaricus bisporuse* viljakehadel (Munch jt 2002).

Erinevad liigid, kes kuuluvad perekonda *Pseudomonas*, mängivad seente kasvul võtmerolli, sest nad on seotud mitmete peamiste etappidega kasvatamise protsessis. Juba olemasolul kompostis ja substraadis mängivad pseudomonaadid olulist rolli, sealhulgas edendades kultiveeritud seente kasvu reproduktiivset faasi. Mitmed uuringud on välja selgitanud *Pseudomonas putida* võtmerolli viljakeha induktsiooni vallandamises (Munch jt 2002). Peale pseudomonaadide selgelt kasulikke mõju seene kasvamisele, kuuluvad mitmed patogeendid samuti perekonda *Pseudomonas*, mis samas hoopis ohustavad kultiveeritud seente saagikust ja kvaliteeti. Bakteriaalne „tilkuvate eoslehekeste haigus“ (ingl. k. drippy gill), mis mõjutab seene viljakehi ja on põhjustatud *Pseudomonas agarici* poolt. Kõige sagedamini on plekihaigust leitud kultiveeritud seentel. Pruunplekkhaigus on peamiselt tingitud bakterist *Pseudomonas tolaasii* ja bakteri *Pseudomonas gingeri* poolt on põhjustatud ingveripleki haigus. Kultiveeritud seenel *Agaricus bisporus* on kirjeldatud kergest helepruuniks kuni värvituks pleekimist ja koe kokkuvarisemist. Nende sümptomite esilekutsumine on omistatud bakterile „*Pseudomonas reactans*“, kes on teine tavaline seene hüüfosfääri elanik. *Pseudomonas tolaasii* on põhiline ja kõige rohkem uuritud kultiveeritud seente patogeen (Munch jt 2002). Bakter *Pseudomonas tolaasii* toodab tolaasiini, ekstratsellulaarset lipodepsipeptiidtoksiini, mida on vaja haiguse sümptomite esilekutsumiseks (Tsukamoto jt 2002). Nende ülekaal patogeenesis on tingitud nende laiast jaotusest, mõjutades mitmeid seenperemehi, kaasa arvatud *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis*, *Pleurotus ostreatus* ja *Pleurotus eryngii* ja põhjustades suurt kahju seenekasvatusele. Seentel esinevate *Pseudomonas tolaasii* infektsioonide identifitseerimine tugineb põhiliselt kahele funktsioonile, nendeks on esiteks pruunide plekkide sümptomi

teke seene viljakehadel ja teiseks valge sademe tootmine agaris, kui bakterid patogeenset vormi on triibustatud bakterid „*Pseudomonas reactans*“ suunas (Munch jt 2002).

5. Seente viljakehi patogeenide eest kaitsevad bakterid

Seenega seotud bakterid võivad oma peremeest kaitsta nii seen- kui bakterhaiguste eest. Näiteks mitmed bakterid kaitsevad peremeest pruunplekkhaigust põhjustava bakterid *Pseudomonas tolaasii* poolt toodetud tolaasiini eest (Tsukamoto jt 2002). Samas on leitud ka, et aktinobakterid võivad inhibeerida sametpuravike perekonnal *Xerocomus* esinevat seenhaigust, mida põhjustab üleniidiku anamorf *Sepdonium microspermum* (teleomorf *Hypomyces microspermus*) (Krüger jt 2008). Suurel hulgal baktereid, eriti pseudomonaade, on leitud ka seene *Agaricus bisporus* substraadist. Paljud neist toodavad aineid, mis parandavad seente kasvu ja vähendavad seenparasiitsete seente kasvu ja parasiitset aktiivsust (Bhatt ja Singh 2002).

Tsukamoto jt (2002) kirjeldasid erinevaid baktereid, kes on isoleeritud seente seltsi *Agaricales* viljakehadest ja kes detoksifitseerivad tolaasiini ning omavad seega potentsiaali pruunplekkhaiguse maha surumiseks. Algselt arvati, et mõned pseudomonaadide liigid, nagu *Pseudomonas fluorescens*, võiksid olla potentsiaalsed biokontrolli agendid, surudes alla sissetungiva bakterid *Pseudomonas tolaasii* populatsioone. See meetod nõuab ettevaatusabinõusid, kuna *Pseudomonas fluorescens* toodab palju antifungiaalseid aineid ja võib saada oportunistlikuks patogeeniks hoopis kultiveeritavatele seentele (Tsukamoto jt 2002).

Tsukamoto jt (1998) leidsid gram-positiivse bakterid, keda ei olnud algselt määratud üheski defineeritud bakteriperekonnas ja kes oli isoleeritud mädanenud kultiveeritud seene *P. ostreatus* viljakehadest. Ta detoksifitseeris tolaasiini ja surus laboritingimustes alla pruunplekkhaiguse arengut seentel *Pleurotus ostreatus* ja *Agaricus bisporus* (Tsukamoto jt 1998). Pärast intensiivseid süstemaatilisi analüüse näidati, et see bakter on uus liige sugukonnas *Microbacteriaceae* ja kirjeldati uus perekond *Mycetocola* ning liik *Mycetocola tolaasinivorans* (Tsukamoto jt 2001). Hiljem kirjeldati selles perekonnas veel kaks liiki, *Mycetocola lacteus* ja *Mycetocola saprophilus*, kellel pruunplekkhaiguse mahasurumise võimet ei ole veel uuritud (Tsukamoto jt 2001). Seni on kõik kolm perekonna *Mycetocola* liiki isoleeritud ainult kultiveeritavatest seentest (Tsukamoto jt 1998; Tsukamoto jt 2001).

Varem on täheldatud, et liik *Mycetocola tolaasinivorans*, mis on isoleeritud kultiveeritud seenest *Pleurotus ostreatus*, detoksifitseeris tolaasiini ja ennetas pruunplekkhaigust laboritingimustes (Tsukamoto jt 2002). Erinevate perekonna *Mycetocola* liikide järjekindel eraldamine nii metsikutest kui kultiveeritud seentest *P. ostreatus*, näitas, et perekond *Mycetocola* on kasutusele võtnud spetsiifilise nišši, seostudes seltsi *Agaricales* seentega. Seega võib ta olla potentsiaalne biokontrolli agent bakteriaalsete haiguste vastu, mitte ainult kultiveeritaval seenel *P. ostreatus*, aga ka teistel seentel (Tsukamoto jt 2002; Tsukamoto jt 2001). Fakt, et tolaasiini detoksifitseerivad bakterid vabanevad seene viljakehadest pärinevasse vette, ilma seenerakke lõhkumata, näitas, et need bakterid olid kinnitunud seene mütseeli pinnale nagu *Pseudomonas tolasii*, mitte ei esinenud elavatena seene protoplasmas (Tsukamoto jt 2002).

Informatsioon tolaasiini detoksifitseerivate bakterite kohta võib olla kasulik ka taimehaiguste kontrolli seisukohast, kuna mõned fütopatogeensed pseudomonaadid on tuntud lipodepsipeptiidsete toksiinide tootjatena, mis on nii keemiliselt kui funktsionaalselt sarnased tolaasiinile ja mis laastavad kultuurtaimi (Tsukamoto jt 2002).

5.1. Bakterid tõrjuvad seentel esinevaid seenhaigusi

Bakterid tõrjuvad seentel lisaks bakterhaigustele ka seenhaigusi. Rohkelt on baktereid, eriti pseudomonaade, leitud seene *Agaricus bisporus* substraadist. Paljud neist toodavad aineid, mis parandavad seente kasvu ja vähendavad seenparasiitsete seente kasvu ja parasiitset aktiivsust. Ohutuse alusel seenele *Agaricus bisporus* valiti välja 5 bakteriisolaati ja testiti neid erinevate mükoparasiitsete seente suhtes. Kõik isolaadid olid antagonistliku toimega patogeensete seente *Verticillium fungicola* ja *Fusarium moniliformae* suhtes ja kolm isolaati leiti veel olevat efektiivsed ka seente *Mycogone pernicioso* ja *Sepedonium chryso sporium* vastu. Üks tüvi kontrollis seene *Trichoderma harzianum* kasvu (Bhatt ja Singh 2002).

Ka seenest *Agaricus bitorquis* (linnašampinjon), mis on kultivatsioonitingimuste suhtes üsna sarnane liigiga *Agaricus bisporus* ja erineb ainult natuke oma bioloogia ja saagi andmiseks vajaliku optimaalse temperatuuri poolest, on leitud bakteried, kes võivad tõrjuda talle ohtlikku seenhaigust. Seene *A. bitorquis* optimaalne temperatuur esimese saagi jaoks on $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ja teise saagi jaoks $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ja on leitud, et need temperatuurid soosivad ka teatud kindlate bakterite olemasolu kompostis ja need bakterid omakorda võivad tõrjuda „valetrühvli haigust“ (the false truffle disease). Eriti on leitud selle haiguse

madalamat esinemissagedust nakatades substraati bakteritega *Bacillus thuringensis* ja *Alcaligenes faecalis* (Ahlawat ja Rai 2000).

5.2. Aktinobakterite mõju sametpuravikel (perekond *Xerocomus*) esinevale parasiitsele seenele *Sepedonium microspermum* Bes I

Uuritud on bakteriaalset kooslust seente *Xerocomus badius* ja *Xerocomus chrysenteron* (*Boletales*) kübara pinnal. Need sametpuravikud on substraadiks parasiitsetele seentele perekonnast *Sepedonium* (Krügeri jt 2008). Krügeri jt (2008) esitasid andmeid seene *Xerocomus* pinnal kasvavate kultiveeritavate aktinobakterite mitmekesisuse kohta ja aktinobakterite ning seente vaheliste interaktsioonide näiteid (Krüger jt 2008). Isoleeritud parasiitseene tüved olid määratud liiki *Sepedonium microspermum*, teleomorf *Hypomyces microspermus* (Bes I 1998) kuuluvatena (Krügeri jt 2008).

Enamik aktinobakterite tüvesid olid isoleeritud seenekübara pinnalt, vaid mõni oli leitud viljakeha seest. Suurem osa neist oli isoleeritud kasutades kitiinagarit. Need aktinobakterite isolaadid kuulusid kõik tavaliste mulda asustavate ja antibiootikume tootvate bakterite perekonda *Streptomyces*. Enamus nendest aktinobakterite isolaatidest inhibeeris parasiitsete *Sepedonium* tüvede kasvu. Kaitse patogeenide vastu on ilmselt seotud sekundaarsete metaboliitidega (Krügeri jt 2008). On leitud ka, et aktinobakterite hulgas on mükoriisa abistaja baktereid (Frey-Klett jt 2007).

5.3. Tolasiini detoksifitseerivad bakterid seltsi *Agaricales* esindajate viljakehades

Bakteriaalsed isolaadid seente seltsist *Agaricales* detoksifitseerivad tolasiini, mis on kultiveeritavatel seentel pruunplekkhaigust esile kutsuv ühend ja see haigus on põhjustatud bakteri *Pseudomonas tolaasii* poolt. Kõikidel tüvedel määrati perekondlik ja liigiline kuuluvus 16S rDNA analüüside alusel, ka võrreldi nende bakterioloogilisi omadusi. *Mycetocola tolaasinivorans* ja *Mycetocola lacteus* olid isoleeritud vastavalt mittemükoriisest (<http://www.mushroomexpert.com>) kandseenest *Pleurotus ostreatus* ja mittemükoriisest (<http://www.mushroomexpert.com>) kandseenest *Lepista nuda* (lilla ebaheinik, violetne heinik). Tolasiini detoksifitseerivad bakterid, kes kuuluvad teistesse perekondadesse, olid leitud erinevatest looduslikest seentest. Perekonna *Acinetobacter* liik oli isoleeritud mükoriisat (<http://www.mushroomexpert.com>) moodustava kandseene

Tricholoma matsutake (männiheinik) viljakehast, bakter *Bacillus pumilus* oli isoleeritud mittemükoriisest (<http://www.mushroomexpert.com>) kandseenest *Coprinellus disseminatus* ja bakter *Sphingobacterium multivorum* oli isoleeritud mittemükoriisest (<http://www.mushroomexpert.com>) kandseenest *Clitocybe clavipes*. Perekonna *Pedobacter* liik oli isoleeritud perekonnast *Clitocybe*. Tolasiini detoksifitseerivad bakterid, kes seni tuvastatud on, olid kinnitunud mütseeli pinnale, mitte elavate seenerakkude sisse. *Mycetocola tolaasinivorans*, *Mycetocola lacteus*, *Bacillus pumilus*, perekonna *Pedobacter* üks liik ja *Sphingobacterium multivorum* detoksifitseerisid efektiivselt tolasiini ja surusid *in vitro* tugevalt alla pruunplekkhaiguse teket kultiveeritud seentes *Pleurotus ostreatus* ja *Agaricus bisporus*. Kõik need bakterid võivad olla kasulikud tolasiini detoksifitseerimise mehhanismide selgitamiseks ja nad võivad saada oluliste seentel leitavate haiguste biokontrolli läbivijateks. Üldiselt supresseerib ka bakter *Pseudomonas fluorescens* sissetungivat bakterit *Pseudomonas tolaasii* (Tsukamoto jt 2002) (<http://elurikkus.ut.ee>).

Bakteriaalseid tüvesid võrreldi nende efektiivsuse poolest tolasiini detoksifitseerimisel. *Mycetocola tolaasinivorans* OM-F11 ja *M. lacteus* OM-A1, mis isoleeriti seltsi *Agaricales* seentest, detoksifitseerisid efektiivselt tolasiini, nagu varem leiti bakteri *M. tolaasinivorans* CM-05 puhul, kes oli pärit kultiveeritud seenest *P. ostreatus*. Need uuringud näitasid, et perekond *Mycetocola* on looduslikult parasiitne mõnede seltsi *Agaricales* seente suhtes ja on võimeline üldiselt detoksifitseerima tolasiini. Sarnaselt detoksifitseerivad bakterid *Bacillus pumilus* OM-F6, *Sphingobacterium multivorum* OM-A8 ja perekonna *Pedobacter* liik tolasiini sama efektiivselt nagu perekonna *Mycetocola* tüved. Perekonna *Acinetobacter* liik oli aga vähemefektiivne. Kui välja arvata bakteri *Bacillus pumilus* tüvi OM-F6, siis üldiselt ei tooda tolasiini detoksifitseerivad bakterid ekstratsellulaarseid proteaase. Seetõttu on usutav, et tolasiini detoksifikatsioon hõlmab mitte üldisi proteolüütilisi, vaid spetsiifilisi mehhanisme, mis on olemas ainult kindlas bakterite grupis. Süмптоomi supressioon oli hästi korreleerunud nende bakterite võimega detoksifitseerida tolasiini (Tsukamoto jt 2002).

6. Ektomükoriisaseente viljakehadega seotud bakterite taksonoomiline mitmekesisus

Dahm jt (2005) kirjeldasid oma uurimuses ektomükoriisete seente viljakehadega seotud kultiveeritavate bakterite mitmekesisust. Ülekaalukaks tüübiks viljakehadest isoleeritud bakterite hulgas olid gram-negatiivsed pulgad, välja arvatud kandseene *Laccaria amethystina* (ametüstrupik) puhul. Viimase puhul olid enamik baktereid gram-positiivsed kokid. Kokikujulisi baktereid on suurel hulgal isoleeritud ka *Hebeloma crustuliniforme* ja *Suillus grevillei* sporokarpidest. Gram-negatiivsetel bakteritel oli oluline sarnasus liikidega *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pickettii* ja *Cromobacterium violaceum*. Need olid ülekaalukad taksonid gram-negatiivsete pulkade hulgas (Dahm jt 2005).

Viljakehi ümbritsevas mullas olid arvukamad gram-muutuvad korünevormsed bakterid, mitte gram-negatiivsed pulgad, mis olid ülekaalus sporokarpide sees. Streptomütseedid, keda ei leitud endobiootiliste bakterite hulgast, olid arvukalt esindatud mullas (Dahm jt 2005).

Isoleeritud ja tuvastatud on ka bakterid perekonnast *Azospirillum*, kes on atsetüleeni redutseerivateks bakteriteks ektomükoriisete seente *Suillus ponderosa* Smith ja Thiers, *Hymenogaster parksii* Zeller ja Dodge (perek maapähkel), *Tuber melanosporum* Vitt. (must trühvel) (Mello jt 2006), *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quel.(pisarhebel), *Laccaria laccata* (Scop.:Fr.) Berk. ja Br. (lakkrupik) ja *Rhizopogon vinicolor* (perekond juurepähkel) viljakehades (Dahm jt 2005) (<http://elurikkus.ut.ee>).

Dahm jt (2005) poolt on puhaskultuuri isoleeritud 27 bakteriliigi tüvesid, nii *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. viljakehadest kui ka *Suillus grevillei-Larix decidua* Mill. ektomükoriisadest. Perekonnad *Pseudomonas*, *Bacillus* ja *Streptomyces* olid valdavad. Mitmed liigid, nagu *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Enterobacter agglomerans*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, olid tavalised nii sporokarpides kui ektomükoriisades (Dahm jt 2005).

Samade seeneliikide sporokarbid, mis kasvasid erinevates elupaikades, sisaldasid erinevaid kultureeritavate bakterite hulki. Suurem hulk baktereid isoleeriti mullast pH-ga 6.3 kui

mullast pH-ga 4.58. Gram-positiivseid spoore moodustavaid aeroobseid batsille ja gram-muutuvaid pleomorfseid baktereid oli samuti leitud sporokarpidest. Spoore moodustavaid baktereid oli kõige sagedamini isoleeritud *Hebeloma crustuliniforme* viljakehadest (Dahm jt 2005).

Bakterite hulk ümbritsevas mullas ja seente sporokarpides oli sarnane või kõrgem mullas, sõltudes mükoriisa liigist ja sellest, et millisest mullast sporokarbid olid kogutud. *Boletus edulis* (Bull.) Fries ja *Amanita muscaria* paistavad olevat bakterivabad. *Tuber borchii* Vittad. sporokarpidest leiti liiki *Pseudomonas fluorescens* (30% kogupopulatsioonist) ja spoore moodustavaid gram-positiivsed bakterid (15% kõigist) (Dahm jt 2005).

Aeroobsed bakterid olid isoleeritud kukeseene *Cantharellus cibarius* (L.) Fries viljakehadest. Domineeriv bakter neist oli *Pseudomonas fluorescens*. Ta hõlmas 12% kogu bakteriisolaatidest mullas ja 78% seene *Cantharellus cibarius* viljakehades. (Dahm jt 2005).

6.1. Bakterite taksonoomiline mitmekesisus trühvliite viljakehades

Alljärgnevalt on kirjeldatud ektomükoriisete seente hulka kuuluvate trühvliikide *Tuber magnatum* ja *Tuber borchii* Vittad. viljakehadest leitud bakterite mitmekesisust ning leitud bakterikoosluste erinevusi ja sarnasusi.

Seeneliikidega *Tuber magnatum* ja *Tuber borchii* seotud bakterikoosluste mitmekesisust on uuritud kasutades 16S rRNA geenidel põhinevat meetodit, mis on kultuur-sõltumatu ja teise meetodina puhaskultuuridel põhinevat meetodit. Järjestusanalüüsid identifitseerisid kuus peamist gruppi eubakterite domäänis, mis sisaldasid liikmeid hõimkonna *Proteobacteria* klassidest α , β ja γ , hõimkondadest *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ja *Firmicutes* ning seda mõlema uuritud *Tuber* liigi puhul (Barbieri jt 2005a; Barbieri jt 2007).

Sekveneerimine näitas märkimisväärset α -proteobakterite osakaalu (634 kõigist 771-st vaadeldud kloonist, seega ligikaudu 82%). Siia kuuluvad perekondade *Sinorhizobium*, *Rhizobium* ja *Bradyrhizobium* liigid seenes *Tuber magnatum* (Barbieri jt 2007). Ka *T. borchii* kloonide enamus olid α -proteobakterid, näidates märkimisväärset sarnasust, rohkem kui 97%, liikmetega grupist *Sinorhizobium/Enisfer*, samuti perekondadega *Rhizobium* ja *Bradyrhizobium*. Mõned kloonid olid seene *Tuber borchii* puhul pärit β - ja γ -

proteobakterite hulgast ja ka madala ja kõrge G+C sisaldusega grampositiivsete bakterite hulgast (Barbieri jt 2005a). Bakteriaalne kultiveeritav fraktsioon oli peamiselt esindatud γ -proteobakterite poolt (210 kõigest isoleeritud 384-st tüvest, seega ligikaudu 55%), sinna kuulusid enamasti fluorestseerivad pseudomonaadid, nagu leiti ka seenest *Tuber magnatum* (Barbieri jt 2007). Enamus isolaatidest liitusid γ -proteobakterite hulka ka seene *Tuber borchii* puhul, taaskord oli tegu enamasti fluorestseerivate pseudomonaadidega. Samas olid mõned isolaadid ka hõimkonna *Bacteroidetes* liikmed ja mõned grampositiivsed bakterid, enamasti sugukonnast *Bacillaceae* (Barbieri jt 2005a).

Fluorestseeriv *in situ* hübriidsatsioon kinnitab, et α -proteobakterid (85,8%) olid valdavad trühvlike bakteriaalsetes kooslustes, koos üsna vaeselt esindatud β -proteobakteritega (1,5%), γ -proteobakteritega (1,9%), hõimkonnaga *Bacteroidetes* (2,1%), hõimkonnaga *Firmicutes* (2,4%) ja aktinobakteritega (3%). Need tulemused saadi seenega *Tuber magantum* tehtud uuringus (Barbieri jt 2007).

Mõlema seene puhul oli näha ka erinevaid tulemusi kahe erineva meetodi kasutamisel. Nendeks meetoditeks olid isolaatide ja kloonide meetodid, esimene põhines bakterite kultuuri viimisel ja teise puhul kasutati 16S rDNA järjestusi. Seene *Tuber borchii* puhul oli näha nende kahe meetodi vahel erinevusi, kui määrata bakteriaalsete hõimkondade erinevad esinemissagedused kultuurkolleksioonis ja kloonide raamatukogu kasutades. Kasutades kloonide meetodit oli suur hulk operatsioonilisi taksonoomilisi ühikuid (OTUsid) identifitseeritud α -proteobakterite hulgast, lähedasi sugulasi leiti perekondadega *Sinorhizobium/Enisfer*, *Rhizobium/Agrobacterium* ja *Bradyrhizobium*. Erinevalt kloonidest sisaldas bakteriaalsete isolaatide kolleksioon ainult mõnda liiget α -proteobakterite hulgast. Beeta-proteobaktiereid ei avastatud kõikides analüüsitud askokarpides ja nad esinesid enamasti kloonidena, mitte isolaatidena. Erinevalt klooni raamatukogudest, kus domineerisid α -proteobakterite OTUd, oli isolaatide kolleksioon tihedalt esindatud fluorestseerivate pseudomonaadide poolt ja gram-positiivsete bakterite poolt (Barbieri jt 2005a). Ka seene *Tuber magnatum* puhul kuulus klooni raamatukogudes enamik kloone α -proteobakterite hulka, isolaatidest aga kuulus suurem osa γ -proteobakterite klassi (Barbieri jt 2007). Mõlema *Tuber* liigi puhul on selgelt näha, et kahekordne lähenemisviis suurendab trühvlike bakteriaalsete koosluste struktuuralse koostise kohta saadud infot, kui võrrelda neid kultiveerimisel ja otsese 16S rDNA järjestuste taastamisega saadud tulemusi (Barbieri jt 2005a; Barbieri jt 2007).

16S rDNA geeniraamatukogu analüüsid võimaldasid erinevate liikide identifitseerimist iga seene *Tuber magnatum* askokarbi küpsusastme puhul. Eriti huvitav oli konstantne ja märkimisväärne α -proteobakterite olemasolu, mis oli esindatud perekondade *Sinorhizobium/Ensifer* ja *Rhizobium/Agrobacterium* liikmete poolt ja *Bradyrhizobium* liikide poolt. Kõik eelnevad perekonnad on hästi tuntud oma võime poolest lämmastikku siduda (Barbieri jt 2007). Samad perekonnad olid esindatud ka seenes *Tuber borchii* (Barbieri jt 2005a). Seenes *Tuber magnatum* olid kõige levinumad kloonid samuti α -proteobakterite hulgas ja nad olid lähedalt seotud bakteriga *Bradyrhizobium elkanii*. Tema OTU oli esindatud igas analüüsitud askokarbis (Barbieri jt 2007).

Need uuringud kinnitasid mittekultiveerimismeetodite tähtsust bakterite mitmekesisuse uurimisel trühvrites (Barbieri jt 2005a; Barbieri jt 2007), eriti kuna kultiveerimisel põhinevate mitmekesisuse uuringutega on ebatõenäoline kajastada tõelist mikroobikoosluse struktuuri *in situ* (Barbieri jt 2005a).

Lisaks vastavad paljud klassi α -proteobakterite liikmed muutustele keskkonnas üleminekuga küll elujõulisse, aga mittekultureeritavasse seisundisse, mis võib seletada tekkinud raskusi *Rhizobia*-laadsete liikide isoleerimisel. Pealegi sisaldavad α -proteobakterid mitmeid sümbiootilisi liike, kes on väga lähedalt seotud oma peremeestega ja neile võivad vajalikud olla ka spetsiifilised füsiokeemilised tingimused, mis lihtsas söötmes puuduvad (Barbieri jt 2007).

6.1.1. Hõimkonna *Proteobacteria* liikmed trühvrites

Seenes *Tuber magnatum* on vastavalt kloonide analüüsidele kõige arvukamalt esindatud klass α -proteobakterid hõimkonnast *Proteobacteria* (Barbieri jt 2007). Ka liigi *Tuber borchii* puhul olid α -proteobakterid kõige laiemalt esindatud proteobakterite hulgas (Barbieri jt 2005a). Enamus neist rühmitub perekonnaga *Bradyrhizobium* seene *Tuber magantum* puhul. Eriti võis märgata iga analüüsitud askokarbi puhul, et küpsusastmest sõltumata püsib konstantsena liikide *Bradyrhizobium elkanii* ja *Bradyrhizobium* N arvukus (Barbieri jt 2007). Seene *Tuber borchii* puhul olid isolaatide enamus ja mõned kloonid märkimisväärselt sarnased (rohkem kui 98%) *Sinorhizobium/Ensifer* bakterite grupi 16S rDNA järjestustega (Barbieri jt 2005a). Mõned kloonid liitusid liigiga *Agrobacterium tumefaciens* ja perekonnaga *Sinorhizobium/Ensifer* ja seda mõlemast seeneliigist saadud kloonide korral. Teised kloonid grupeerusid perekonnaga *Mesorhizobium* seene *Tuber magnatum* puhul ja sugukondadega *Phyllobacteriaceae* ja *Bradyrhizobiaceae* seene *Tuber*

borchii puhul. Mõned kloonid ja üks bakteriaalsete isolaatide esindaja moodustasid eraldi klatri, mis on tihedalt seotud bakteriga *Rhizobium giardinii*, teda leiti samuti mõlema seenega läbiviidud uuringust. Seene *Tuber borchii* puhul oli enamus β -proteobakterite liikmeid esindatud pigem kloonide kui isolaatide poolt, seene *Tuber magnatum* puhul aga vastupidi (Barbieri jt 2007; Barbieri jt 2005a).

Mõlema seene puhul leiti 16S rDNA järjestused, mis näitasid olulist sarnasust (> 98%) liigiga perekonnast *Varivorax*. Paljud seenega *Tuber magnatum* seotud bakterid osutusid isolaatide uuringu käigus γ -proteobakteriteks, samuti ka enamus seenega *Tuber borchii* seotud bakteritest. Enamusel on märkimisväärne sarnasus fluorestseerivate pseudomonaadidega ja täpsemalt liikidega *Pseudomonas constantinii*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas linii*, *Pseudomonas jessenii* ja seene *Tuber borchii* puhul ka liigiga *Pseudomonas marginaalis*. Mõned rühmitused seene *Tuber magnatum* puhul sugukondadega *Xanthomonadaceae*, *Moraxellaceae* ja *Enterobacteriaceae* ja ka seene *Tuber borchii* puhul sugukonda *Xanthomonadaceae*. Nii isolaatidest, kui kloonidest grupeerusid osad veel kirjeldamata liikide hulka perekonnas *Pseudomonas* ja mittekultureeritud bakterite hulka mõlemas seeneliigis (Barbieri jt 2007; Barbieri jt 2005a).

6.1.2. Hõimkonna *Bacteroidetes* esindajad trühvlites

Märkimisväärne grupp operatsioonilisi taksonoomilisi ühikuid (OTUsid), mis esinesid seene *Tuber magnatum* ja *Tuber borchii* viljakehades, olid hõimkonna *Bacteroidetes* esindajad. Järjestused olid nii isolaatide hulgast kui kloonide hulgast pärit (Barbieri jt 2007; Barbieri jt 2005a). Seene *Tuber magnatum* puhul kuulusid need esindajad sugukondadesse *Sphingobacteriaceae*, *Flexibacteriaceae* ja *Flavobacteriaceae* (Barbieri jt 2007). Seene *T. borchii* puhul kuulusid enamus järjestustest klassi *Sphingobacteria*, perekonda *Sphingobacter*. Mõned järjestused seenest *Tuber borchii* saadud bakteriisolaatidest kuuluvad ka klassi *Flavobacteria* (Barbieri jt 2005a). märkimisväärseid sarnasusi ei täheldatud ei kloonide ega isolaatide hulgas perekonna *Flexibacter* puhul, see perekond on seotud *Tuber borchii* hüüfidega, aga seenega *Tuber magnatum* mitte (Barbieri jt 2005a; 2007).

6.1.3. Hõimkondade *Firmicutes* ja *Actinobacteria* liikmed trühvlites

Enamus hõimkonna *Firmicutes* liikmetest on esindatud isolaatide poolt, mitte kloonide poolt ja seda mõlema seeneliigi puhul (Barbieri jt 2007; Barbieri jt 2005a). Seene *Tuber magnatum* puhul kuulusid nad sugukondadesse *Staphylococcaceae*, *Listeriaceae* ja *Bacillaceae* (Barbieri jt 2007). Liigi *Staphylococcus pasteurii* tüvesid, kes on isoleeritud seene *Tuber magnatum* viljakehast ja keda on leitud ka mikropaljundatud taimede juurtelt, iseloomustas nende antimükotiiline aktiivsus *Tuber borchii* seeneniidistiku kasvu suhtes (Barbieri jt 2005a). Üks kloon sugukonnast *Clostridiaceae* oli avastatud üksikul harul, seotuna liigiga *Clostridium botulinum*, sarnasusega 86%-i (Barbieri jt 2007). Seene *Tuber borchii* puhul langes üks isolaat hästi määratletud liigi *Bacillus cereus* gruppi. Kloon CI-7A-TB3-I langes üksikule rRNA harule, sarnanedes liigiga *Bacillus thuringensis* AF290545 (sarnasus 97%) ja üks isolaat klasterdus hõimkonda *Firmicutes* kuuluva liigi *Bacillus pumilis* juurde (Barbieri jt 2005a). Nii isolaatide kui kloonide hulgast oli leitud ka hõimkonna *Actinobacteria* esindajaid. Hõimkonda *Actinobacteria* esindasid seene *Tuber borchii* puhul sugukonnad *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae* ja *Nocardiaceae*, seene *Tuber magnatum* puhul veel lisaks ka sugukond *Propionibacteriaceae* (Barbieri jt 2007; Barbieri jt 2005a).

7. Seentes teadaolevaid funktsioone täitvad bakterid ja nende spetsiifilisus

Bakterid, keda on eraldatud seente viljakehadest või ümbritsevast substraadist, on näiteks perekonnad *Pseudomonas* ja *Bacillus* (Wang jt 2011; Choundhary jt 2009; Cho jt 2003a; Zaranejad jt 2012; Noble jt 2009a; Citterio jt 2001; Cho jt 2008a). Lämmastikku siduvatest bakteritest on leitud perekondade *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ja *Paenibacillus* esindajaid, aga ka liiki *Pseudomonas fluorescens* (Barbieri jt 2005a, 2007; Jayasinghearachchi ja Seneviratne 2004). Tolasiini kahjutustavad perekonnad *Mycetocola*, *Pedobacter* ja *Acinetobacter* ja ka liigid *Bacillus pumilus* ja *Sphingobacterium multivorum* (Tsukamoto jt 2002). Leitud on ka, et aktinobakterid võivad maha suruda parasiitset seeneperekonda *Sepedonium* (Krüger jt 2008). Üldiselt on aktinobaktereid leitud ka seene *Pleurotus ostreatus* substraadist (Cho jt 2008a) ja seene *Tuber borchii* ektomükoriisadest ja askokarpidest (Barbieri jt 2005a; Sbrana jt 2002a), kuid seal pole nende funktsioone uuritud.

Ektomükoriisaseentes on üldiselt perekonnad *Pseudomonas*, *Bacillus* ja *Streptomyces* ülekaalus, seda kinnitab ka näiteks seene *Suillus grevillei* viljakehaga ja ektomükoriisaga läbiviidud uuring. Kukeseenest *Cantharellus cibarius*, mis on samuti ektomükoriisaseen, on ka leitud bakterit *Pseudomonas fluorescens* (Dahm jt 2005). Ka trühvlite puhul leiti isolaatide põhjal, et kõige rohkem on fluorestseeruvaid pseudomonaade. (Barbieri jt 2005a; Barbieri jt 2007). Trühvlite puhul on ka perekond *Bacillus* hästi esindatud. Selle esindajad on näiteks seotud liigi *Tuber borchii* eoskoti avanemisega (Citterio jt 2001). Ka *Chroogomphus rutilus* on ektomükoriisaseen ja ka selle liigi puhul leiti perekondade *Bacillus* ja *Pseudomonas* esindajaid (Wang jt 2011).

Samas on perekonda *Pseudomonas* leitud ka seene *Pleurotus ostreatus* ja bakteriperekonna *Bradyrhizobium* koostoimel tekkinud biofilmist võimaliku lämmastiku sidujana (Cho jt 2003a) ja ka kasvusubstraadist viljakeha moodustumise edendajana (Cho jt 2008a). Seenest *Agaricus bisporus* on leitud ka nii perekondi *Bacillus* kui *Pseudomonas* (Choundhary jt 2009), näiteks pseudomonaadide mõju on peetud väga oluliseks just seene *Agaricus bisporus* noore viljakeha arengul (Noble jt 2009a; Zaranejad jt 2012). Seega võib oletada, et vähemalt perekonnad *Pseudomonas* ja *Bacillus* ei ole arvukalt esindatud mitte ainult ektomükoriisaseente hulgas, vaid ka mittemükoriisete seente hulgas, nagu *Agaricus bisporus* ja *Pleurotus ostreatus* ja ka see, kas tegemist on kand- või kottseenega ei avalda suurt mõju, kui järeldada nende näidete põhjal.

Alljärgnevalt on kirjeldatud seente viljakehadest ja substraadist leitud bakterite omadusi ja seenega interakteerumise ainulaadsust.

7.1. Perekonnad *Mycetocola* ja *Pedobacter*

Bakteriperekonnad *Mycetocola* ja *Pedobacter* on samas alapeatükis kajastatud, kuna nad omavad seenes sama funktsiooni, nimelt tolasini detoksifitseerimine.

Bakteriperekond *Mycetocola* on klassifitseeritud hõimkonda *Actinobacteria* (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>). Kõik perekonna *Mycetocola* tüved on isoleeritud ainult kultiveeritavatest seentest (Tsukamoto jt 1998; Tsukamoto jt 2001). Seega võib selle põhjal oletada, et see perekond baktereid on spetsiifiliselt kohastunud eluks seoses seentega. Morfoloogiliste, füsioloogiliste ja kemotaksonoomiliste omaduste, samuti DNA-DNA reassotsiatsiooni väärtuste ja 16S rRNA geenijärjestuse võrdluse andmetel loodi uus perekond *Mycetocola* sugukonnas *Microbacteriaceae* ja sinna

paigutati kolm uut liiki: *Mycetocola saprophilus*, *M. tolaasinivorans* ja *M. lacteus* (Tsukamoto jt 2001).

Kõik perekonna *Mycetocola* liikmed on võimelised detoksifitseerima tolasiini, mis on toodetud bakteri *Pseudomonas tolaasii* poolt (Tsukamoto jt 2001). Selle perekonna esindajad on gram-positiivsed, mittesporuleeruvad, mitteliikuvad ja kujult ebaregulaarsed pulgad. Nad on aeroobsed ja mingit kasvu ei tuvastatud anaeroobsetes tingimustes. Optimaalne temperatuur kasvuks on 25°C juures ja maksimaalne kasvutemperatuur on 33°C. Ükski tüvi ei kasva 4°C juures (Tsukamoto jt 2001).

Perekond *Pedobacter* kuulub hõimkonda *Bacteroidetes* ja sisaldab liike *Pedobacter heparinus* (*Sphingobacterium heparinum*), *P. piscium* (*Sphingobacterium piscium*), *P. africanus*, *P. saltans* ja tänaseks on sellesse perekonda lisandunud veel mitmeid liike (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>). Sellel perekonnal on üldine sarnasus perekonna *Sphingobacterium* esindajatega. Perekonda *Pedobacter* võib eristada perekonnast *Sphingobacterium* näiteks võime poolest toota heparinaasi. Pealegi kõik heparinaasi tootvad bakterid on isoleeritud mullast või aktiivmudast, samal ajal enamus perekonna *Sphingobacterium* tüvesid on kliinilist päritolu (Steyn jt 1998). Ka liik *Sphingobacterium multivorum* on tolasiini detoksifitseerivate omadustega ja teda on leitud samuti seente seltsist *Agaricales* (Tsukamoto jt 2002).

Perekonna *Pedobacter* enamus tüvesid on heparinaasi tootvad, obligatsed aeroobid ja gram-negatiivsed. Kujult on selle perekonna liikmed üldiselt pulgad, ümarate või veidi kitsenevate otstega. Ühtegi piilit ega viburit ei ole leitud. Liikumisel on tuvastatud libisevat mootorikat mõnedel tüvedel. Neile sobiv temperatuurivahemik on tavaliselt 5 ja 30 kraadi vahel, aga mõned tüved võivad kasvada ka 37°C juures (Steyn jt 1998).

Mõlemaid bakteriperekondi on leitud seente seltsist *Agaricales* ja seal detoksifitseerivad nad efektiivselt tolasiini, surudes alla bakteri *Pseudomonas tolaasii* poolt põhjustatavat haigust (Tsukamoto jt 2002).

7.2. Perekonnad *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* ja *Rhizobium*laadsed bakterid

Antud perekonnad on esitatud samas alapeatükis, kuna omavad seenes sama funktsiooni, nimelt lämmastiku sidumine.

Lämmastikku siduvate bakterite perekondi on leitud nii trühvlistest, mis on kottseened kui ka seenest *Pleurotus ostreatus*, mis on kandseen (<http://elurikkus.ut.ee>). Samal ajal on trühvliste puhul tegu ektomükoriisaseentega ja liik *Pleurotus ostreatus* ei ole mükoriisaseen (<http://www.mushroomexpert.com>). Seega ei sõltu bakterite esinemine, vähemalt antud bakteriperekondade puhul, seene hõimkonnast, ega mükoriisusest. Erinevusena võib siiski välja tuua, et perekonna *Tuber* liikidest on taksonoomiliste uuringute käigus leitud perekondi *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ja *Bradyrhizobium*, samal ajal seene *Pleurotus ostreatus* puhul ka liiki *Pseudomonas fluorescens* (Jayasinghearachchi ja Seneviratne 2004; Barbieri jt 2005a, 2007).

Lämmastikku siduvad bakterid ei ole spetsiifiliselt kohastunud eluks seoses seenega, kuna enamuse lämmastikku siduvaid baktereid tekitavad liblikõielistel taimedel juurenooduleid ja seovad samuti lämmastikku (Boone jt 2005), seega nad võivad seostuda nii seente kui taimedega. Samas kui on võrreldud näiteks nitrogenaaset aktiivsust liblikõieliste taimede varastes juurenoodulites ja perekonna *Bradyrhizobium* nitrogenaaset aktiivsust seenes *Tuber magnatum*, siis on saadud täiesti võrreldavad tulemused (Barbieri jt 2010a), seega ei pruugi lämmastiku sidumine seenes esinevate bakterite poolt olla sugugi vähemtähtis, lihtsalt seda on vähem käsitletud.

7.2.1. Perekond *Bradyrhizobium*

Perekond *Bradyrhizobium* kuulub hõimkonda *Proteobacteria* (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>). Algselt kuulusid perekonna *Bradyrhizobium* liigid perekonda *Rhizobium*. Siis otsustati osad aeglaselt kasvavad ja happeid mittetootvad liblikõieliste taimede juurenoodulite bakterid lahutada eraldi perekonnaks (Jordan 1982). Perekonna *Bradyrhizobium* tüüpliigiks on liik *B. japonicum* (Jordan 1982). Selle perekonna liikmed on gram-negatiivsed, aeroobsed ja kujult lühikesed pulgad. Liiguvad ühe polaarse või subpolaarse viburiga. Optimaalne kasvutemperatuur on 25-30 °C (Jordan 1982).

Perekonna *Bradyrhizobium* liikmed stimuleerivad noodulite moodustumist troopilistel ja mõnedel parasvöötme liblikõielistel taimedel, nagu perekondadel *Glycine*, *Vigna* ja *Macroptilium*. Lisaks teatud kiirekasvulistele tüvedele perekonnast *Rhizobium*, põhjustavad ka perekonna *Bradyrhizobium* liikmed noodulite teket taimeperekondadel *Lotus*, *Lupinus*, *Ornithopus*, *Cicer*, *Sesbania*, *Leucaena*, *Mimosa*, *Lablab* ja *Acacia*. Selle perekonna liikmed fikseerivad atmosfäärist lämmastikku, olles sümbiootilises seoses

juurenoodulitega. Tavaliselt on nad happetolerantsed, enamus tüvesid kasvavad pH 4.5 juures. Üle 30% tüvedest kasvab pH juures 4.0 ja mõned isegi nii madalal nagu 3.5, aga neile ei sobi pH 9.0 (Jordan 1982).

7.2.2. Perekond *Sinorhizobium*

Perekond *Sinorhizobium* kuulub hõimkonda *Proteobacteria* (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>). See grupp on identifitseeritud kui kiiresti kasvavate sojaoa juurenoodulites elavate bakterite perekond. Nad on lämmastikku fikseerivad bakterid, keda identifitseeriti mullast ja sojaoa juurenoodulitest (Chen jt 1988).

Perekonna *Sinorhizobium* liigid on pulgad, tavaliselt sisaldavad polü- β -hüdrosübutüraadi graanuleid. Spore nad ei moodusta ja on gram-negatiivsed. Liiguvad ühe polaarse viburiga või rohkem kui kolme peritrihse viburiga. Nad on aeroobsed, vajades hapnikku terminaalse elektroni aktseptorina. Optimaalne temperatuur on 25-30°C, aga enamus tüvesid kasvavad 35°C juures ja mõned 10°C juures. Optimaalne pH 6-8, mõned tüved kasvavad ka pH 5.0 juures ja teised pH 10.5 juures (Chen jt 1988).

Enamus selle perekonna liikmetest ei oma eriti laia peremeeste ringi, aga efektiivselt noduleerivad nad taimeliike *Glycine soja* (harilik sojauba) mitmeid *Glycine max* (karvane sojauba) tüvesid, liiki *Vigna unguiculata* cv. VITA-3 ja liiki *Cajanus cajan* cv. CITA-1 (Chen jt 1988) (<http://elurikkus.ut.ee>).

7.2.3. Rhizobiumilaadsed bakterid

Perekond *Rhizobium* kuulub samuti hõimkonda *Proteobacteria* (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>). Bakterid on pulgakujulised, gram-negatiivsed ja ei moodusta spore. Nad liiguvad ühe kuni kuue peritrihse viburiga. Siia perekonda kuuluvad bakterid on aeroobsed, optimaalne temperatuur kasvuks on 25-30°C, optimaalne pH kasvuks 6-7. Kasvades karbohüdraatsel söötmel toodavad ohtralt eksrtatsellulaarseid polüsahhariide (Boone jt 2005).

Kõigi perekonna *Rhizobium* liikide puhul on teada tüved, mis indutseerivad taimedes hüpertroofiat juurenoodulite tekkega ja seda kas koos või ilma lämmastiku sidumiseta. Mitmed sümbiootiliste bakteriliikide rakud sisenevad liblikõieliste taimede (sugukond *Leguminosae*) juurekarva rakkudesse, kus bakterid tegutsevad intratsellulaarsete sümbiontidena, tavaliselt fikseerivad lämmastikku (Boone jt 2005).

Nodulatsiooniga (nod geenid) ja lämmastiku fikseerimisega seotud geenid (nif geenid) on klasterdunud suurtesse plasmiididesse või megaplasmiididesse. Peremeestaimede spetsiifika on teatud määral kindlaks määratud lipokito-oligosahhariidsete *Nod* faktorite poolt. Need kitiinilaadsed molekulid indutseerivad noodulite teket bakterite puudumisel. Bakterid, kes asuvad juurenoodulites endofüütidena, võivad vähendada või fikseerida gaasilist lämmastikku (Boone jt 2005). Lähedalt sugulased perekonnale *Rhizobium* on perekonnad *Agrobacterium* ja *Sinorizobium* (Boone jt 2005).

Perekond *Rhizobium* on levinud muldades ülemaailmselt ja eriti taimede risosfääris. Looduslikult esinevad ka tüved, mis on lämmastiku fikseerimisel küll ebaefektiivsed, aga võivad olla efektiivsed taimede nakatamises ja noodulite tekitamises, seeläbi limiteerides taimede kasvu (Boone jt 2005).

7.3. Perekonnad *Pseudomonas* ja *Bacillus*

Antud bakteriperekonnad on ühes alapeatükis, kuna neil tundub seni avaldatud uuringute põhjal olevat kõige rohkem funktsioone seentes või seente kasvusubstraadis. Samuti on neil olulisi ühiseid omadusi, eelkõige tsellulolüütiline ja kitinolüütiline aktiivsus (Citterio jt 2001).

Kultiveeritavate seente viljakehade küpsemisega võib seni avaldatud andmete põhjal kõige rohkem seostada perekondi *Pseudomonas* ja *Bacillus*. Mõlemad on leitud seente *Chroogomphus rutilus* ja *Agaricus bisporus* viljakehadest ja/või substraadist. Samas on batsillid seene *Agaricus bisporus* viljakehadest gram-positiivsetest bakteritest kõige arvukamalt esindatud grupp, mille esindajatel otsest funktsiooni ei ole seal küll veel tuvastatud (Wang jt 2011; Choundhary jt 2009). Samuti mõjutavad mõlemad bakteriperekonnad tõenäoliselt ka askuse avanemist seenel *Tuber borchii* (Citterio jt 2001). Ka perekond *Bacillus* on seotud tolasini kahjutustamisega, nagu perekond *Pseudomonas* (Tsukamoto jt 2002). Üldiselt peetakse nende bakteriperekondade puhul oluliseks nende tsellulolüütilist ja eriti kitinolüütilist aktiivsust (Citterio jt 2001). Ka Dahm jt (2005) on väitnud, et kitinolüütiline aktiivsus on sporokarpidest isoleeritud bakterite üldine tunnusjoon.

7.3.1. Perekond *Pseudomonas*

Perekonna *Pseudomonas* liigid on üldlevinud, kuuludes hõimkonna *Proteobacteria* γ -proteobakterite klassi (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>), kes asustavad

mitmesuguseid muldi, vett ja taimede pindasid (Anbuselvi jt 2010). Perekonda *Pseudomonas* kuuluvad bakterid on gram-negatiivsed, rangelt aeroobsed, polaarsete viburitega pulgad. Nad on erinevate põllukultuuride risosfääri agressiivsed koloniseerijad. Nad omavad tüüpiliselt polaarset viburit. (Brenner jt 2007).

Selle perekonna liikmetele on iseloomulik pigmentatsioon, näiteks püoverdiinid on ühendid, mis tekitavad pigmentatsiooni. Püoverdiinid funktsioneerivad ka siderofooridena. Parim temperatuur kasvuks on umbes 28°C. Mõned selle perekonna liikmed taluvad happelist keskkonda. Mitmed perekonna *Pseudomonas* liigid toodavad ka eksopolüsahhariidi alginaat (Brenner jt 2007).

Perekonnas *Pseudomonas* on taimedele ja seentele patogeenseid liikmeid. Nad põhjustavad taimedel erinevaid sümptomeid, nagu tuumorite väljakasv, mädanik, kloroos ja nekroos, mis tekivad taimerakkude metabolismi muutumise tagajärjena. Neid muutusi põhjustavad patogeenide poolt eritatud ühendid. Nende ühendite hulgas on toksiinid, taimehormoonid ja ensüümid, mis on võimelised nakatama erinevaid taimeraku komponente. Samal ajal on leitud baktereid, kes omavad taimepatogeenide suhtes laia toimespektriga antagonistlikku aktiivsust, nagu antibioos (inhibitorsete komponentide tootmine), siderofooride tootmine ja toitumise või elupaiga konkurents (Anbuselvi jt 2010). Mõned perekonna *Pseudomonas* liigid võivad ka tekitada sellise vesiniksüaniidi (HCN) taseme, mis on toksiline kindlatele patogeensetele seentele. Need omadused teevad perekonna *Pseudomonas* liigid sobivateks kandidaatideks, et neid kasutada bakterväetiseks seemnetele ja kaitseks juurtele mullast pärinevate taimepatogeenide eest. Bakterid perekonnast *Pseudomonas* hõlmavad suure aktiivset biokontrolli teostavate tüvede grupi. Seda eelkõige nende üldise võime tõttu toota erinevates hulkades potentsiaalseid antifungiaalseid metaboliite (Anbuselvi jt 2010). Uuringud on näidanud, et umbes 40% risosfääris leiduvatest bakteritest stimuleerivad taime kasvu ja 40% inhibeerivad ja 20%-il ei ole efekti (Brenner jt 2007).

Erinevate bakteri *Pseudomonas fluorescens* tüvede antifungiaalset aktiivsust on testitud mõnede taimepatogeenide, nagu *Alternaria cajani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium sp.*, *Bipolaris sp.* ja *Helminthosporium sp.* suhtes *in vitro*. Tulemus näitas, et kõik bakteri *Pseudomonas fluorescens* tüved on efektiivsed taimepatogeenide *Alternaria cajani* ja *Curvularia lunata* vastu (Anbuselvi jt 2010).

Tuvastatud on mullas elavate pseudomonaadide kasulik mõju musta trühvli (*Tuber melanosporum*) sümbioosi tekkele. Must trühvel ise on ektomükoriisne kottseen. See võib

tuleneda pseudomonaadide kaitsvast efektist mulla päritoluliste konkurentide suhtes musta trühvli mükorisosfääris. Seega pseudomonaadid võivad edendada ka mükoriisa moodustumist. Samas on ka kinnitatud bakteriaalsete isolaatide vastuselekttsiooni mükoriisa tekkele, näiteks nad võivad represseerida ebatsuuga (*Pseudotsuga menziesii*)-sinilamell-rupiku (*Laccaria bicolor*) sümbioosi tekkimist (Frey-Klett jt 2007; Mello jt 2006) (<http://elurikkus.ut.ee>).

Perekonna *Pseudomonas* esindajatel on seente viljakehades ja nende ümbruses väga mitmeid erinevaid funktsioone. Liiki *Pseudomonas fluorescens*, kes on võimeline lämmastikku siduma, on leitud seene *Pleurotus ostreatus* pinnalt (Cho jt 2003a). *Pseudomonas fluorescens* olulist rolli askuse avanemisel on näidatud seene *Tuber borchii* puhul (Citterio jt 2001). Samuti on arvatud, et *Pseudomonas fluorescens* võiks olla ka potentsiaalne biokontrolli agent, kes võib hävitada sissetungiva patogeense pseudomonaadi *Pseudomonas tolaasii* (Tsukamoto jt 2002). Samuti on leitud, et pseudomonaadid on antagonistlikud mitmete seenel *Agaricus bisporus* esinevate patogeensete seente suhtes (Bhatt ja Singh 2002). Perekonna *Pseudomonas* esindajaid peetakse ka seene *Agaricus bisporus* kasvu mõjutajateks, kuna nad seovad lenduvaid orgaanilisi ühendeid (VOC), mida toodavad seenehüüfid ise, et inhibeerida oma kasvufaasi üleminekut reproduktiivsesse faasi ja seega on takistatud ka viljakehade teke. Eriti tähelepanuväärseks peetakse siinjuures liiki *Pseudomonas putida*. Kõige inhibitoorsemaks lenduvaks orgaaniliseks ühendiks peetakse seene *Agaricus bisporus* mütseeli poolt toodetavat 1-okteen-3-ooli (Zaranejad jt 2012; Noble jt 2009a). Perekonna *Pseudomonas* liigid on ka seente peamiste bakterhaiguste põhjustajateks. Olulisemad neist on pruunplekkhaigus, haigus, „tilkuvate eoslehekeste haigus“ (ingl. k. drippy gill) ja ingveripleki haigus, tekitajateks on vastavalt *Pseudomonas tolaasii*, *P. agarici* ja *P. ginger*. Hiljuti on kirjeldatud pruunplekkhaiguse põhjustajana ka bakter *Pseudomonas constantinii* (Munch jt 2002).

Kuna perekonna *Pseudomonas* liigid täidavad seenes väga mitmeid funktsioone ja ta on seotud erinevate seentega, siis võiks püüda leida põhjusi, miks just see perekond on seentega nii tihedalt seotud. Võib oletada, et kuna enamus haigustekitajaid on pärit sellest perekonnast, siis algselt patogeenidena esinenud bakterid on omandanud uued funktsioonid ja asustavad nüüd viljakehade sisemust ja viljakehi ümbritsevat substraati. Samas evolutsioonipuu (Munsch jt 2002), viitab pigem vastupidisele võimalusele kuna näiteks üks levinuim haigustekitaja seentel, nimelt *P. tolaasii*, on hoopis üks nooremaid liike

perekonnas *Pseudomonas*. Samas aga perekonna *Mycetocola* liikide kohta võib see oletus isegi paika pidada, kuna Tsukamoto jt (2002) artiklis on mainitud, perekond *Mycetocola* on parasitne mõnede seltsi *Agaricales* seente suhtes.

7.3.2. Perekond *Bacillus*

Perekond *Bacillus* kuulub hõimkonda *Firmicutes* (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>). Perekonna *Bacillus* liikmed on gram-positiivsed, spore moodustavad, pulgakujulised ja aeroobsed bakterid (Brian jt 1995). Maksimaalne kasv esineb temperatuuril 31-76°C (Warth 1978). Endosporid on resistentsed keemilisele ja füüsikalisele stressile. Sellises olekus on bakterid vastupidavad kuumusele ja suudavad pikemat aega elada kuivuses ja on resistentsed ka ioniseerivale kiirgusele ja UV kiirgusele (Brian jt 1995).

Suur hulk perekonna *Bacillus* liike toodavad piimhapet. Piimhapet tekitavad tüved on isoleeritud mullast, riknenud toidust või piimast, haigete mesilase vastsetest ja erinevate taimede risosfäärast ning vähi soolestikust (Brian jt 1995).

Perekonna *Bacillus* hulgas on liike, mis võivad tõrjuda seenhaigusi ka taimedel. Näiteks *Bacillus subtilis* QST713 kuulub ühe biofungitsiidi koostisse, mis vähendab *Plasmodiophora brassicae* poolt põhjustatud rapsi infektsiooni. On võimalik, et antibioos ja indutseeritud kaitse osalevad selle biofungitsiidi poolt esile kutsutud haiguse supressioonis, kuna biofungitsiidiga nakatamise tagajärjel suureneb peremehe enda kaitseotstarbeliste geenide ekspressioon, mis kooderivad kindlate ühendite radasid. Nendeks ühenditeks on jasmoonhape, etüleen ja fenüülpropanoidid, mille geenide ekspressioon suurenes 2.2-23 korda (Lahlali jt 2013). Seega bakteriperekonna *Bacillus* puhul ei ole kaitse haigustekitajate eest spetsiifiline ainult seentele, vaid perekonna *Bacillus* liigid võivad tõrjuda haigustekitajaid ka taimedel või aidata kaasa nende tõrjele.

Kimura ja Hirano (1988) isoleerisid ka kaks liigi *Bacillus subtilis* tüve, mis on võimelised inhibeerima alfatoksiini tootva seene *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 ja *Aspergillus flavus* NRRL 3357 kasvu ja ka alfatoksiini tootmist, need seened on tavalised pähklikes ja maisis.

Seene mütseeli poolt toodetud VOC-id võivad inhibeerida viljakehade moodustumist, nagu seda on näidatud aedšampinjoni puhul (Noble jt 2009a; Zaranejad jt 2012), aga VOC-id võivad olla toodetud ka bakterite poolt ja inhibeerida näiteks patogeensete seente kasvu.

Üheks taimedel esineva patogeense seene tõrjujaks on liik *Bacillus amyloliquefaciens*, tüvi NJN-6. See bakter toodab lenduvaid orgaanilisi ühendeid (VOC-e), mis inhibeerivad seene *Fusarium oxysporum* rapsile spetsialiseerunud vormi kasvu ja eoste idanemist. Uuriti 36-t lenduvat ühendit ja 11 nendest inhibeerisid seene kasvu täielikult. Nende ühendite seenevastane aktiivsus näitab, et VOC-id on eelpool mainitud patogeense seene alla surumisel olulised nii pikkade kui lühikeste vahemaade tagant (Yan jt 2012).

Bakterid, keda on leitud sojaoast ja rapsist, toodavad antifungiaalseid lenduvaid orgaanilisi ühendeid (VOC-e). Nende bakterite poolt toodetud ühendid inhibeerivad liigi *Sclerotia sclerotium* mütseeli kasvu ja eoste idanemist. Leitud on, et eoste idanemine väheneb 54-90% VOC-ide tootjate tõttu. VOC-ideks võivad olla aldehüüdid, alkoholid, ketoonid ja sulfiidid. Selle seene puhul leiti kuus komponenti, mis täielikult inhibeerivad mütseeli kasvu ja sklerootiumi moodustumist, seega näitasid nad oma potentsiaalset rolli biokontrollis. Need komponendid olid bensotiasool, tsükloheksanool, n-dekanaal, dimetüültrisulfiid, 2-etüül-1-heksanool ja nonanaal (Fernando jt 2005a).

Arutelu

Kultiveeritavte seente *Pleurotus ostreatus*, *A. bisporus*, *T. magantum* ja *T. borchii* viljakehades ja viljakehi ümbritsevas substraadis esinevate bakterite siiani tuvastatud peamised funktsioonid on lämmastiku sidumine (Barbieri jt 2005a, 2007, 2010a), viljakehade kasvu indutseerimine (Choudhary jt 2009; Noble jt 2009a; Citterio jt 2001; Barbier jt 2007a; Cho jt 2003a, 2008a) ja seente kaitsmine patogeenide eest (Tsukamoto jt 1998, 2001, 2002; Krügeri jt 2008). Kuigi ka lämmastiku fikseerimine ja viljakehade tekke edendamine on omavahel seotud funktsioonid, kuna pärast primordiumi moodustumist muutuvad trühvlid sõltumatuks peremeestaimest ja vajavad seega toitainete kättesaamisel bakterite abi (Barbieri jt 2010a). Seega ka lämmastiku kättesaadavus reguleerib vähemalt osaliselt viljakehade arengut, samuti suurendab viljakehade hulka ja kvaliteeti vastupanuvõime patogeenidele. Seda on väidetud ka seene *Agaricus bisporus* viljakehade arenguga seoses, et süsiniku ja lämmastiku osakaal kompostis on oluline seene saagikuse mõjutaja (Choundary jt 2009). Haigustekitajate eest kaitsmisega tegelevad tolasiiini detoksifitseerivad bakterid perekondadest *Mycetocola* ja *Pedobacter* ning liigid *Bacillus pumilus*, *Sphingobacterium multivorum* ja *Pseudomonas fluorescens* (Tsukamoto jt 2002). Võttes aluseks andmed, et mitmed bakteri *Pseudomonas fluorescens* tüved on

efektiivsed näiteks taimepatogeenide *Alternaria cajani* ja *Curvularia lunata* kasvu pidurdamisel (Anbuselvi jt 2010), siis ei ole perekonna *Pseudomonas* omadus kaitsta seent haigustekitajate eest spetsiifiline ainult seene ja bakterite vahelisele interaktsioonile. Tolasiini detoksifitseerimine on üldiselt väga spetsiifiline protsess (Tsukamoto jt 2002), aga ka mõned fütopatogeensed pseudomonaadid toodavad tolasiini laadseid ühendeid, seega võivad tolaasiini detoksifitseerimise mehhanismid kasutuses olla ka taimede ja bakterite vahelistes interaktsioonides (Tsukamoto jt 2002). Ka perekond *Bacillus* kaitseb lisaks seentele haigustekitajate eest ka taimi, selle perekonna liigid tõrjuvad mitmeid taimede seenhaigusi (Lahlali jt 2013; Yan jt 2012). Seega ei ole ka seene ja perekonna *Bacillus* vaheline funktsionaalne seos selle bakteriperekonna jaoks ainulaadne. Samas perekond *Mycetocola* võib omane olla ainult seentele ja tõrjuda seentele patogeenseid baktereid, kuna seda bakteriperekonda ei ole seni mujalt leitud kui seentest (Tsukamoto jt 1998; Tsukamoto jt 2001). Lisaks on leitud, et aktinobakterid võivad kaitsta seeneperekonna *Xerocomus* viljakehi parasitise seene *Sepedonium microspermum* eest (Krüger jt 2008). Aktinobaktereid on taksonoomiliste uuringute käigus leitud ka trühvlitest *Tuber magnatum* ja *Tuber borchii* (Barbieri jt 2005a; Barbieri jt 2007), kus nad arvatavasti täidavad samuti teatud kaitsefunktsiooni. Samuti on leitud aktinobaktereid seene *Pleurotus ostreatus* substraadist (Cho jt 2008a). Üheski eelpool mainitud seenes ei ole aga selle bakterihõimkonna funktsioone uuritud. Igal juhul kasvavad aktinobakterite populatsioonid seenes *Pleurotus ostreatus*, nagu seene mütseeli kasvu edendava perekonna *Pseudomonas* populatsioonidki ja seda viljakeha moodustumise käigus (Cho jt 2008a).

Lämmastiku sidumisega seentes tegelevad bakterid perekondadest *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* ja *Sinorhizobium* (Barbieri jt 2010a; Barbieri jt 2005a; Jayasinghearachchi ja Seneviratne 2004). Ka lämmastikku siduvad bakterid ei ole spetsiifiliselt kohastunud eluks seoses seenega, kuna enamus lämmastikku siduvaid baktereid tekitavad liblikõielistel taimedel juurenoduleid ja seovad nendes lämmastikku (Boone jt 2005). Taimedes on lämmastikku siduvad bakterid samuti peamiselt kolmest eelpool nimetatud perekonnast pärit (Chen jt 1988). Seente puhul on lämmastikku fikseerivatest bakteritest praeguste andmete kohaselt kõige rohkem tähelepanu pööranud perekonnale *Bradyrhizobium*. Selle perekonna puhul on just funktsionaalsus seenes kõige kindlamini määratud, teiste lämmastikku siduvate bakterite puhul on tuvastatud lämmastiku sidujad pigem taksonoomiliste uuringute käigus (Barbieri jt 2005a; Barbieri jt 2007). Seene *Tuber magnatum* puhul tuvastati perekonnale *Bradyrhizobium* omaste nifH geenide tugev

ekspressioon ja teatud määral leiti siiski ka perekonna *Sinorhizobium* geenide avaldumist (Barbieri jt 2010a). Ka seen *Pleurotus ostreatus* puhul saadi märkimisväärne lämmastiku hulga tõus ja katses kasutati siin perekonna *Bradyrhizobium* liikmeid (Jayasinghearachchi ja Seneviratne 2004). Peamine liik lämmastikufikseerijate hulgast, keda on leitud seoses seentega, on bakter *Bradyrhizobium elkanii*, keda on leitud üldiselt sojaoa juurenoodulite moodustajana (Rumjanek jt 1993). Seega võib oletada, et ta on üsna spetsiifiline ühele taimeliigile ja ei ole seetõttu ilmselt kõige levinum lämmastikufikseerija taimede hulgas.

Viljakeha arengut mõjutavatest bakteritest on kõige levinum perekond *Pseudomonas*, sealhulgas eriti liigid *P. putida* ja *P. fluorescens* (Choudhary jt 2009; Citterio jt 2001; Cho jt 2003a; 2008a; Danell jt 1993). Samuti on perekonnad *Acinetobacter* ja *Bacillus* seotud ilmselt viljakehade tekke esile kutsumisega (Choudhary jt 2009). Sugukond *Bacillaceae* ja liik *Pseudomonas fluorescens* on olulised eeskoti avanemisel oma kitinolüütilise aktiivsuse tõttu (Citterio jt 2001). Dahm jt (2005) on samuti väitnud, et kitinolüütiline aktiivsus on viljakehadest isoleeritud bakterite üldine tunnusjoon.

Kui võrrelda ülal loetletud seentes teatud funktsiooni täitvate bakteriperekondade omadusi, mis on kokkuvõtlikult toodud tabelis 1, selgub, et enamikel perekondadel on kasvuks suhteliselt sarnased optimaalsed temperatuurid. Ainult perekonnal *Bacillus* on see vahemik natuke laiem ja seda ilmselt võime tõttu moodustada endospore (Warth 1978). Samuti on enamus seentes ja nende ümbruses leiduvatest bakteritest gram-negatiivsed. Ka Dahm jt (2005) on väitnud ektomükoriisaseentega läbi viidud uuringu põhjal, et gram-negatiivsed pulkbakterid olid sporokarpide seest isoleeritud bakterite hulgas ülekaalus. Käesolevas töös olid ektomükoriisaseentest käsitletud ainult trühvlid ja männiliimik *Chroogomphus rutilus*. Seenes *C. rutilus* oli üks kahest arvukamast bakteriperekonnast perekond *Bacillus*, kuhu kuuluvad tegelikult hoopis gram-positiivsed bakterid (Wang jt 2011). Üldiselt on perekond *Bacillus* käesolevas töös käsitletud seentest gram-positiivsete bakterite peamine esindaja, keda on leitud mittemükoriisetest kandseentest *Agaricus bisporus* (Choudhary jt 2009) ja *Coprinellus disseminatus* (Tsukamoto jt 2002), aga ka trühvlitest, kuigi tuvastatud arvukus oli madal (Barbieri jt 2007; Barbieri jt 2005a). On alust arvata, et pulgakujulistel bakteritel võib olla mingi eelis seente asustamisel või teatud kindel ülesanne, kuna kõik käesolevas töös käsitletud olulisemate bakteriperekondade liikmed olid kujult pulgad ja neid leidis nii gram-positiivsete kui gram-negatiivsete bakterite hulgas. Seda väidet kinnitab näiteks see, et pulgakujulised bakterid on ilmselt võimelised uuristama askuse seinu ja koloniseerima askuste sisemust ja seeläbi võivad

osaleda askuse avanemisel (Citterio jt 2001). Elupaiga poolest olid enamus nendest bakteriperekondadest laialt levinud mullas ja taimede risosfääris, samas on need ka seente kasvuga kõige lähemalt seotud elupaigad.

Kui võrrelda kahe trühvli liigi puhul seal leiduvate bakterite taksonoomilist mitmekesisust, siis selgub, et seal esinevate bakterite põhigrupid ja nende osatähtsus on samad. Nimelt identifitseeriti järjestusanalüüside abil kuus peamist bakterite gruppi, nendeks olid hõimkonna *Proteobacteria* klassid α , β ja γ , hõimkond *Bacteroidetes* ja hõimkonnad *Actinobacteria* ja *Firmicutes*. Mõlema trühvli liigi puhul oli vastavalt 16S rDNA järjestuste põhjal tehtud analüüsidele kõige arvukam klass α -proteobakterid, aga bakterite kultuuri viimisel põhinevate meetodite alusel olid kõige arvukamad hoopis γ -proteobakterid, täpsemalt fluorestseerivad pseudomonaadid (Barbieri jt 2005a; Barbieri jt 2007). Fülogeneetilised analüüsid on näidanud, et 85% viljakehadest eraldatud bakteriaalsetest isolaatidest kuulusid γ -proteobakterite gruppi ka mittemükoriise kandseene *Agaricus bisporus* bakteriaalse mitmekesisuse uurimisel ja ülejäänud sealt eraldatud isolaadid olid batsillid (Choudhary jt 2009). Seega ei ole see iseloomulik ainult trühvlitele, et isolaatide abil saadakse kõige suuremal hulgal γ -proteobaktereid. α -proteobakterite hulgast on mõlema trühvli liigi puhul esindatud perekonnad *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* ja *Sinorhizobium* (Barbieri jt 2005a; Barbieri jt 2007). γ -proteobaktereid on isolaatide hulgas rohkem, kuna nad on kiirekasvulisemad kui α -proteobakterid ja ei lähe keskkonnatingimuste muutumisel üle mittekultiveeritavasse seisundisse ja seetõttu on neid lihtsam puhaskultuuri viia kui α -proteobaktereid. Samuti võivad γ -proteobakterid söötme suhtes vähemnõudlikumad olla, kui α -proteobakterid (Barbieri jt 2007). Tõenäoliselt on α -proteobaktereid üldiselt siiski rohkem kui γ -proteobaktereid, aga neid on võimalik tuvastada enamasti ainult kloonide meetodil 16S rDNA analüüside alusel. Lämmastikku siduvate bakterite suur hulk seentes võib olla tingitud sellest, et seene sees on lihtsam kaitsta oma nitrogenaaset kompleksi hapniku eest. Ilmselt on oluline ka võimalus saada seentelt fosforit ja süsinikku, kuna energiakulu on lämmastiku sidumisel suur (Li ja Hung 1987; Jayasinghearachchi ja Seneviratne 2004). Eriti sobiv võib seenes kasvamine olla perekonna *Bradyrhizobium* esindajatele, kuna selle perekonna bakterid kasvavad aeglaselt. Seene sees on stabiilsem keskkond, kus on aega kasvada, samas on ka seene viljakeha siiski üsna lühiealine ja bakter peaks sel juhul oma aktiivsema eluetapi ajastama just seene viljakeha tekkega samale ajale.

Kokkuvõte

Käesoleva töö põhjal võib järeldada, et peamised funktsioonid, mida bakterid seente viljakehades ja nende kasvusubstraadis täidavad, on lämmastiku fikseerimine, viljakehade kasvu edendamine ja patogeenid alla surumine. Kahte esimest funktsiooni täitvaid baktereid esineb nii kott- kui kandseentes või nende substraadis. Erinevusi neid antud funktsioone täitvate bakterite esinemises ei ole ka sõltuvalt sellest, kas tegu on mükoriisat moodustava seenega või mitte. Patogeenide supresseerimist on siiani tuvastatud nii saprootroofsetes kui mükoriisat moodustavates kandseentes, mitmekesisust kirjeldavate uuringute käigus on seenhaigusi allasuruvaid aktinobaktereid leitud ka trühvlitest.

Antud töö põhjal võib öelda, et kõige rohkem erinevaid funktsioone seente viljakehades ja kasvusubstraadis täidavad bakteriperekonnad *Pseudomonas* ja *Bacillus*. Nad on ka väga erinevates seentes esindatud. Liik *Pseudomonas fluorescens* on võimeline lämmastikku siduma ja osalema askuse avanemises, nagu ka liik *Bacillus pumilus*, ja seda vastavalt seentes *Pleurotus ostreatus* ja *Tuber borchii*. Samuti on leitud, et liigid *Pseudomonas fluorescens* ja *Bacillus pumilus* võivad olla ka potentsiaalsed biokontrolli agendid, nii seen- kui bakterhaiguste vastu seentes. Perekonna *Pseudomonas* esindajaid peetakse ka seene *Agaricus bisporus* kasvu mõjutajateks, kuna nad seovad lenduvaid orgaanilisi ühendeid (VOC-e). Kultiveeritavate seente peamised haigustekitajad kuuluvad samuti perekonda *Pseudomonas*. Kokkuvõttes kuulub perekonna *Pseudomonas* poolt mõjutatavate seente hulka nii kott- kui kandseeni ning mükoriisseid ja mittemükoriisseid seeni. Perekonda *Bacillus* on leitud veel seente *Chroogomphus rutilus* ja *Agaricus bisporus* viljakehadest ja/või substraadist. Nende kahe bakteriperekonna puhul peetakse oluliseks nende tsellulolüütilist ja eriti kitinolüütilist aktiivsust, just seetõttu võivad nad omada ka kõige rohkem funktsioone erinevates seentes.

Lämmastikku siduvaid baktereid on tuvastatud enamasti trühvlites, aga ka kandseene *Pleurotus ostreatus* ja *Bradyrhizobium* tüvede poolt moodustatud biofilmis. Seentes funktsionaalsetena on seni kirjeldatud eelkõige perekonna *Bradyrhizobium* liikmeid, eriti liiki *Bradyrhizobium elkanii*. Üldiselt on see liik taimede hulgas tavaline sojaoa noduleerija ja võib oletada, et mitte nii levinud lämmastikusiduja, kui seente hulgas. Liiki *Bradyrhizobium elkanii* on tuvastatud erinevate seeneliikidega läbiviidud uuringutes.

Seeneseoseliste bakterite hulgas on kõige levinumad α -proteobakterid, kui arvesse võtta kloonidega tehtud uuringuid, aga kui kultuuri viidud bakteriisolaate, siis hoopis γ -

proteobakterid. Sellised tulemused saadi kahe trühvli liigi puhul, aga ka mittemükoriisse kandseene *Agaricus bisporus* puhul on isolaatide analüüsil leitud, et 85% viljakehadest eraldatud bakteritest kuulusid γ -proteobakterite hulka. Seega isolaatide põhjal tehtud analüüsid näitavad samu tulemusi nii mükoriisete kottseente trühvlite puhul, kui mittemükoriisse kandseene puhul. Seega võib bakterite mitmekesisus erinevate hõimkondade ja eluviisidega seentes olla üsna sarnane ja ka sõltuvus meetodist, mida on kasutatud bakterite tuvastamiseks, on ka sarnane. Perekonna *Tuber* kahe eri liigiga seotud bakterite mitmekesisus ja taksonoomiline jaotus on samuti väga sarnaned antud juhul.

Võrreldes seentes teatud funktsioone täitvaid bakteriperekondi (vt Lisad, Tabel 1) on sarnaseks omaduseks optimaalsed temperatuurid. Samuti on enamus bakteritest gram-negatiivsed. Ka Dahm jt (2005) on väitnud ektomükoriisaseentega läbi viidud uuringu põhjal, et gram-negatiivsed pulkbakterid olid sporokarpide seest isoleeritud bakterite hulgas ülekaalus. Käesolevas töös olid ektomükoriisaseentest käsitletud küll ainult trühvlid ja *Chroogomphus rutilus* ja nende puhul olid ülekaalus gram-negatiivsed pulkbakterid. Kõik leitud bakterid olid kujult pulgad ja oletatavasti võib see omadus bakteritele seente asustamisel oluline olla. Enamus nendest bakteriperekondadest on esindatud mullas või taimede risosfääris, ilmselt ongi nad nendest keskkondadest liikunud seentesse või nende pinnale.

Kui vaadelda seente ja teiste organismide ning bakterite vaheliste interaktsioonide spetsiifilisust, siis lämmastiku sidumine vastavate bakterite poolt ja patogeenide tõrjumine pseudomonaadide ning batsillide poolt on väga levinud ka taimede hulgas. Seega need ei ole spetsiifilised interaktsioonid. Ainult seentele võib aga olla spetsialiseerunud bakteriperekond *Mycetocola*, mille liikmeid on seni leitud ainult seentest.

FUNCTIONAL AND TAXONOMIC DIVERSITY OF BACTERIA ASSOCIATED WITH FRUITBODIES OF FUNGI

Mari Pent

Summary

On the basis of the present work it can be concluded that the main functions, that bacteria perform in the fruitbodies of fungi and in their casing layer, are nitrogen fixation, promotion of the growth of sporocarps and suppression of pathogens. Bacteria that perform the first two functions occur in asco- and basidiomycetes or in their casing layer. There are no differences between the existence of those bacteria that perform those given functions depending on whether the fungi are mycorrhizal or not. So far the suppression of pathogens has been detected in saprotrophic as well as in mycorrhizal basidiomycetes. In the studies that describe the diversity of bacteria it has been found that truffles also include actinobacteria, that suppress fungal diseases.

It can be concluded that bacteria with the most different functions in sporocarps of fungi and in their casing layer are performed by members of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*. They are present in very different fungi. *Pseudomonas fluorescens* is able to fix nitrogen and take part in opening of the ascus, just like *Bacillus pumilus*, in *Pleurotus ostreatus* and *Tuber borchii*, respectively. Also, it has been found, that these two bacterial species can be the potential agents of biocontrol against the fungal as well as bacterial diseases of fungi. Members of genus of *Pseudomonas* are also considered to be the growth promoters of *Agaricus bisporus*, because of their ability to fix the volatile organic compounds (VOC). The main pathogens of cultivated fungi also belong to the genus of *Pseudomonas*. Members of this genus have been found from fruitbodies of asco- and basidiomycetes as well as mycorrhizal and non-mycorrhizal fungi. Members of the genus *Bacillus* has been found from sporocarps of *Chroogomphus rutilus* and *Agaricus bisporus* and/or from their casing layer. In the case of these two genera of bacteria, their cellulolytic and especially chitinolytic activity have been considered important that probably result the highest number of functions in various fungi.

Nitrogen fixing bacteria have mostly been discovered in ascomycetous truffles, but also in biofilm which is formed by basidiomycetous *Pleurotus ostreatus* and *Bradyrhizobium* strains. So far primarily the members of *Bradyrhizobium* has been described as being functional, in fungal fruitbodies or biofilm, especially *B. elkanii*. Generally this species is

common among the nodulators of the soya bean, but probably not so widely distributed nitrogen fixators among the fungi. Members of *Bradyrhizobium* have been detected in different studies, conducted with different fungal species.

Among the bacteria that are associated with fungi α -proteobacteria appear most common in studies based on clone libraries. However, when considering only bacteria isolated into pure culture, the γ -proteobacteria are the most common. Such results were obtained from two truffle species, but also from analysis of isolates from non-mycorrhizal basidiomycetous *Agaricus bisporus*. In the latter, it has been found that 85% of bacteria isolated from sporocarps belong to the γ -proteobacteria. Thus the analyses of isolates show the same results in case of mycorrhizal ascomycetous truffles and non-mycorrhizal members of the Basidiomycota. Bacterial diversity in fungi from different phyla and having different life strategies can be quite similar. The dependence of method, which is used in order to identify the bacteria is also similar. Bacterial diversity and taxonomic distribution in this case are also very similar between two different species of *Tuber*.

Comparing the genera of bacteria that perform certain functions in fungi (Table 1), one of their common properties is their similar optimum temperature. Also majority of the bacteria are Gram-negative. Studying ectomycorrhizal fungi, Dahm et. al. (2005) claimed that Gram-negative rods were prevailing among the bacteria, isolated from sporocarps. Although only truffles and *C. rutilus* were represented in this work from ectomycorrhizal fungi, also in their case the Gram-negative rods were prevailing. All of bacteria, that were found were rods and presumably their uniform shape can be important for the colonization of fungi. Majority of these genera of bacteria are represented in soil and in the rhizosphere of plants, apparently they have moved from these environments to the fungi or to their surface.

The present work also addressed the specificity of interactions between fungi and bacteria and as compared to those between bacteria and other organisms. In this regard, nitrogen fixation by some known bacteria and suppression of pathogens by pseudomonads and bacilli do not appear unique, being also very common among plants. On the other hand the bacterial genus of *Mycetocola* can be specialized to fungi. Members of this genus have so far only been found from fungi.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Kadri Põldmaad, heade nõuannete ja igakülgse abi eest.

Kasutatud kirjandus

Ajakirjaartiklid:

Ahlawat, O. P., Rai, R. D. 2000. Bacterial inoculants and their effect on the pinning, yield, and false truffle disease incidence in *Agaricus bitorquis*. Science and Cultivation of Edible Fungi. 695-699.

Anbuselvi, S., Jeyanthi, R., Karunakaran, C. M. 2010. Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* and its biopesticide effect on plant pathogens. National Journal on ChemBiosis. 1: 15-18.

Barbieri, E., Bertini, L., Rossi, I., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., Zambonelli, A., Stocchi, V. 2005. New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. FEMS Microbiology Letters 247: 23-35.

Barbieri, E., Ceccaroli, P., Salterelli, R., Guidi, C., Potenza, L., Basaglia, M., Fontana, F., Baldan, E., Casella, S., Ryahi, O., Zambonelli, A., Stocchi, V. 2010. New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*. Fungal Biology. 114: 936-942.

Barbieri, E., Guidi, C., Bertaux, J., Frey-Klett, P., Garbye, J., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Zambonelli, A., Stochhi, V. 2007. Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. Environmental Microbiology. 9: 2234-2246.

Bhatt, N., Singh, R. P. 2002. Casing soil bacteria as biocontrol agents against the mycoparasitic fungi of *Agaricus bisporus*. Mushroom Biology and Mushroom Products. 171-177.

Bonfante P., Anca I.-A. 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi and Bacteria: A Network of Interactions. Annu. Rev. Microbiol. 63: 363-383.

Chen, S., Qiu, C., Huang, T., Zhou, W., Qi, Y., Gao, Y., Shen, J., Qiu, L. 2013. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing bacteria on the hyphal growth and primordium initiation of *Agaricus bisporus*. Fungal Ecology. 6: 110-118.

Chen, W. X., Yan, G. H., Li, J. L. 1988. Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* Be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 38: 392-397.

- Cho, Y. S., Weon, H. Y., Joh, J. H., Lim, J. H., Kim, K. Y., Son, E. S., Lee, C. S., Cho, B. G. 2008. Effect of Casing Layer on Growth Promotion of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Mycobiology*. 36: 40-44.
- Cho, Y.-S., Kim, J.-S., Crowley, D. E., Cho, B.-G. 2003. Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Letters*. 218: 271-276.
- Choundhary, D. K., Agarwal P. K., Johri, B. N. Characterization of functional activity in composted casing amendments used in cultivation of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Indian Journal of Biotechnology*. 8: 97-109.
- Citterio, B., Malatesta, M., Battistelli, S., Marcheggiani, F., Baffone, W., Saltarelli, R., Stocchi, V., Gazzanelli, G. 2001. Possible involvement of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillaceae* in structural modifications of *Tuber borchii* fruit bodies. *Can. J. Microbiol.* 47: 264-268.
- Dahm, H., Wrotniak, W., Strzelczyk, E., Li, C.-Y., Bednarska, E. 2005. Diversity of culturable bacteria associated with fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi. *Phytopathol. Pol.* 38: 51-62.
- Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., Savchuk, S. C. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 955-964.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka, M. 2007. *Transley review*. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*. 176: 22-36.
- Jayasinghearachchi, H. S., Seneviratne, G. 2004. Can mushrooms fix atmospheric nitrogen? *J. Biosci.* 29: 293-296.
- Jordan, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32: 136-139.
- Kimura, N., Hirano, S. 1988. Inhibitory Strains of *Bacillus subtilis* for Growth and Alfatoxin-production of Alfatoxigenic Fungi. *Agric. Biol. Chem.* 52: 1173-1179.

- Lahlali, R., Peng, G., Gossen, B. D., McGregor, L., Yu, F. Q., Hynes, K., Hwang, S. F., McDonald, M. R., Boyetchko, S. M. 2013. Evidence that the Biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis*) Suppresses Clubroot on Canola via Antibiosis and Induced Host Resistance. *Phytopathology*. 103: 245-254.
- Larsen, M. J., Jurgensen, M. F., Harvey, A. E., Ward, J. C. 1978. Dinitrogen fixation associated with sporophores of *Formitopsis pinicola*, *Fomes fomentarius* ja *Echinodontium tinctorium*. *Mycologia*. LXX: 1217-1221.
- Li, C. Y., Hung, L. L. 1987. Nitrogen-fixing (acetylene-reducing) bacteria associated with ectomycorrhizae of Douglas-fir. *Plant and Soil*. 98: 425-428.
- Lumini, E., Ghignone S., Bianciotto V., Bonfante Paola. 2006. Endobacteria or bacterial endosymbionts? To be or not to be. *New Phytologist*. 170: 205-208.
- Mello, A., Murat, C., Bonfante, P. 2006. Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiol Lett*. 260: 1-8.
- Munch, P., Alatossava, T., Marttinen, N., Meyer, J.-M., Christen, R., Gardan, L. 2002. *Pseudomonas costantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 1973-1983.
- Noble, R., Dobrovin-Pennington, A., Hobbs, P. J., Pederby, J., Rodger, A. 2009. Volatile C8 compounds and pseudomonads influence primordium formation of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*. 101: 583-591.
- Rumjanek, N. G., Dobert, R. C., Berkum, van P., Triplett, E. W. 1993. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 4371-4373.
- Sbrana, C., Agnolucci, M., Bedini, S., Lepera, A., Toffanin, A., Giovannetti, M., Nuti, M. P. 2002. Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. *FEMS Microbiology Letters*. 211: 195-201.
- Steyn, P. L., Segars, P., Vancanneyt, M., Sandra, P., Kersters, K., Joubert, J. J. 1998. Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four

species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family *Sphingobacteriaceae* fam. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 48: 165-177.

Zarenejad, F., Yakhchali, B., Rasooli, I. 2012. Evaluation of indigenous potent mushroom growth promoting bacteria (MGPB) on *Agaricus bisporus* production. World J Microbiol Biotechnol. 28: 99-104.

Tsukamoto, T., Murata, H., Shirata, A. 2002. Identification of Non-Pseudomonad Bacteria from Fruit Bodies of Wild Agaricales Fungi That Detoxify Tolaasin Produced by *Pseudomonas tolaasii*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 2201-2208.

Tsukamoto, T., Shirata, A., Murata, H. 1998. Isolation of a Gram-positive bacterium effective in suppression of brown blotch disease of cultivated mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*, caused by *Pseudomonas tolaasii*. Mycoscience. 39: 273-278.

Tsukamoto, T., Takeuchi, M., Shida, O., Murata, H., Shirata, A. 2001. Proposal of *Mycetocola* gen. nov. in the family *Microbacteriaceae* and three new species, *Mycetocola saprophilus* sp. nov. and *Mycetocola tolaasinivorans* sp. nov. and *Mycetocola lacteus* sp. nov., isolated from cultivated mushroom, *Pleurotus ostreatus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 937-944.

Wang, P., Liu, Y., Yin, Y., Jin, H., Wang, S., Xu, F., Zhao, S., Geng, X. 2011. Diversity of Microorganisms Isolated from Soil Sample surround *Chroogomphus rutilus* in Beijing Region. International Journal of Biological Sciences. 7: 209-220.

Warth, A. D. 1978. Relationship Between the Heat Resistance of Spores and the Optimum and Maximum Growth Temperatures of *Bacillus* Species. Journal of Bacteriology. 134: 699-705.

Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q. 2012. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Applied and Environmental Microbiology. 78: 5942-5944.

Raamatud:

Boone, D. R., Castenholz, R. W., Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg N. R. ja Staley J. T. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, Part 3. Springer. US. pp. 325-340.

Brenner Don J., Krieg, Noel R., Garrity George M., Staley James T. 2007. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Springer. US. pp. 324-354.

Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Vol. 2. Springer. US. pp. 368-375.

Poster:

Krüger, D., Hommel, K., Norbert, A., Tarkka, M. 2008. Bacterial associates of bolete fruiting bodies. Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ.

Internetileheküljed:

Eesti eElurikkus. [<http://elurikkus.ut.ee>]. 20. mai 2013

Encyclopedia Britannica.

[<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/48203/bacteria/272364/Growth-of-bacterial-populations#toc272365>]. 15. mai 2013

J.P. Euzeby: List of Procaryotic names with Standing in Nomenclature. [<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>]. 20. mai 2013

MushroomExpert.Com. [<http://www.mushroomexpert.com>]. 10. mai 2013

The alchemist. [<http://www.leffingwell.com/alkenol.htm>]. 18. mai 2013

LISAD

TUNNUSED	SEENTES TEATUD FUNKTSIOONE TÄITVAD BAKTERIPEREKONNAD						
	<i>Mycetocola</i>	<i>Pedobacter</i>	<i>Brady-rhizobium</i>	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Pseudo-monas</i>	<i>Bacillus</i>
Gram-reaktiivsus	+	-	-	-	-	-	+
Raku kuju	pulgad	pulgad	pulgad	pulgad	pulgad	pulgad	pulgad
Hapniku kasutamine	ranged aeroobid	ranged aeroobid	aeroobid	aeroobid	aeroobid	ranged aeroobid	aeroobid
Optimaalne temperatuur	25°C	5-30°C	25-30°C	25-30°C	25-30°C	28°C	25-67°C
Spooride moodustamine	ei moodusta	ei moodusta	ei moodusta	ei moodusta	ei moodusta	ei moodusta	moodustavad
Liikuvus	mitte-liikuvad	mõnel juhul libisev liikumine	liikuvad	liikuvad	liikuvad	liikuvad	liikuvad
Elupaik	seenest <i>P. ostratus</i>	muld ja aktiiv-muda	liblikõieliste juure-noodulites	peamiset sojaoa juure-noodulits	juure-noodulites, risosfääris, mullas	muld, vesi, taimede pind	muld, riknenud toit, taimede risosfäär, vähi soolestik

Tabel 1. Seentes ja ümbritsevas substraadis leiduvate bakterite peamised tunnused ja üldine elupaiga eelistus

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Mari_Pent _____
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev:
_____ 22.05.1991 _____)

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

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ Kadri_Pöldmaa _____,
(*juhendaja nimi*)

- 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 alates **27.05.2013** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **27.05.2013**