



EESTI MAAÜLIKOOL  
Metsandus- ja maaehitusinstituut

**Elisabeth Rähn**

**OKASPUUENAMUSEGA MAJANDUSMETSAD  
SEENPATOGEENIDE LEVIK JA DÜNAAMIKA  
LÕPPRAIETE JÄRGSES METSAMULLAS**  
FUNGAL PATHOGENS DISTRIBUTION AND DYNAMICS IN  
MANAGED CONIFER STANDS AFTER FINAL FELLING

Magistritöö

Loodusvarade kasutamise ja kaitse õppekava

Juhendajad: dotsent Rein Drenkhan, *PhD*

spetsialist Tiia Drenkhan, *MSc*

dotsent Ivar Sibul, *PhD*

Tartu 2016

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Magistritöö lühikokkuvõte	
Autor: Elisabeth Rähn		Õppekava: loodusvarade kasutamine ja kaitse	
Pealkiri: Okaspuuenamusega majandusmetsade seenpatogeenide levik ja dünaamika lõppraiete järgses metsamullas			
Lehekülgi: 37	Jooniseid: 2	Tabeleid: 7	Lisaid: 0
Osakond: Metsakasvatust Uurimisvaldkond: Metsapatoloogia Juhendajad: Rein Drenkhan, Tiia Drenkhan, Ivar Sibul Kaitsmiskoht ja aasta: Tartu 2016			
<p>Juuremädanikud on okaspuudele suurimat majanduslikku kahju tekitavad patogeenid. Raiete järgselt tekkinud kannud on kõige ohtlikumale juuremädaniku tekitajale, s. o juurepessule (<i>Heterobasidion</i> spp.) heaks levimisviisiks, ning patogeeni esinemist ning tekitatud kahju ulatust on oluline uurida. Magistritöö peamine eesmärk oli kirjeldada olulisemate juuremädanike tekitajate esinemist ning dünaamikat viljakas metsamullas vahetult peale uuendusraiet ning aasta hiljem. 25-st kuuse- ning 25-st männienamusega puistust, ning sama paljudelt kontrollaladelt koguti kahel järjestikusel aastal kokku 200 mullaproovi, millest määrati Illumina sekveneerimise meetodil mullaelustiku koosseisud. Saadud nukleotiidide järjestused määrati automaatselt taksoniteks 97 % identsusega INSD ja UNITE andmebaaside abil. Kokku tuvastati 88 976 taksonoomilist üksust, millest 82 000 kuulusid seeneriiki. Kõige enam seeni (50%) kuulus kandseente (<i>Basidiomycota</i>) hõimkonda, seeneliike tuvastati 1270. Kahel järjestikusel aastal ei olnud juurepessu ega külmaseene (<i>Armillaria</i> spp.) osakaal raiumata ja raiutud kuusikute ega männikute võrdluses statistiliselt usaldatavalt erinevad. Kuusikutes esines külmaseent ning juurepessu enam kui männikutes, samuti mädanikuga kändusid. Saadud andmemaht võimaldab erinevate seenerühmade edasist uurimist. Edasistes juuremädanike analüüsides võetakse hinnangutesse olulisi parameetreid nagu muldade keemiline koostis ja mullatüüp, ning antagonistide osakaal mullas.</p>			
Märksõnad: <i>Heterobasidion</i> , <i>Armillaria</i> , juuremädanikud, Illumina sekveneerimine, lageraie			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		<b>Abstract of Master's Thesis</b>	
Author: Elisabeth Rähn		Specialty: Natural resources management	
Title: Fungal pathogens distribution and dynamics in managed conifer stands after final felling			
Pages: 37	Figures: 2	Tables: 7	Appendixes: 0
Department: Silviculture Field of research: Forest pathology Supervisors: Rein Drenkhan, Tiia Drenkhan, Ivar Sibul Place and date: Tartu 2016			
<p>Root rot is one of the most dangerous pathogen on conifers and this is caused high economical loss for forestry in northern Europe. The tree stumps that are formed after felling are a good substrate for the colonization of <i>Heterobasidion</i> spp. Therefore, it is important to study the occurrence and extent of the damage caused by the root rot pathogens. The aim of the master thesis was to characterize pathogenic fungal communities and dynamics of 50 conifer (<i>Pinus sylvestris</i> and <i>Picea abies</i>) clear-cut areas on fertile forest site types recently after felling and one year apart, with the emphasis on root rot pathogens. Another 50 areas were chosen for control areas, where the soil samples were collected on two consecutive years. The collected samplings were analysed with Illumina sequencing to determine the structure of the fungal biota. The sequences were automatically designated to taxon units according to similarity level of 97% by INSD and UNITE databases. 88 976 taxonomic units were detected, of which 82 000 was a part of the fungi. The majority of the analysed fungi belonged to the <i>Basidiomycota</i> with 1270 taxon units. On the analysed consecutive years the proportions of <i>Heterobasidion</i> and <i>Armillaria</i> spp. did not differ statistically significantly depending on the management activity (clear-cut area and control area) nor the pine and spruce dominating stands. The <i>Armillaria</i> spp and <i>Heterobasidion</i> spp occurred more frequently in spruce forests. The collected data enables to study different groups of fungi more specifically. Further studies about the root rot analyses should also regard different important characteristics, e.g. the soil chemical composition, the soil type and the proportion of antagonists in the soil.</p>			
Keywords: <i>Heterobasidion</i> , <i>Armillaria</i> , root rot, Illumina sequencing, clear-cut			

## SISUKORD

Sissejuhatus .....	5
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1 Seenetaksunid Eestis .....	7
1.2 Okaspuudel esinevad seenpatogeenid .....	7
1.2.1 Juurepess .....	8
1.2.2 Külmasseen .....	9
1.3 Raiete mõju juuremädanike teitajatele .....	9
2. Materjal ja metoodika .....	11
2.1 Katsealad ja mullaproovide kogumine .....	11
2.2 Välitööd .....	12
2.2.1 Mullaproovide kogumine .....	12
2.3 Labortööd .....	13
2.3.1 Molekulaarne metoodika seenetaksunite määramiseks .....	13
2.3.2 Bioinformaatiline analüüs .....	15
2.4 Statistiline analüüs .....	16
3. Tulemused ja arutelu .....	17
3.1 Ülevaade määratud seenetaksunitest .....	17
3.2 Juuremädanike tekitajad .....	18
3.3 Juuremädanike esinemise võrdlus kahel aastal .....	24
3.4 Visuaalne mädaniku esinemine raiesmikel kändude järgi .....	26
3.5 Teised muldades enam esinevad seenpatogeenid .....	28
Kokkuvõte .....	29
Tänuavaldused .....	31
Summary .....	32
Kasutatud kirjandus .....	34
Lihtlitsents .....	38

## Sissejuhatus

Mullas elutsevatel seentel on ökosüsteemis oluline roll, seened on tähtsad orgaanilise aine lagundajad, sümbiondid, aga ka taimepatogeenid, mis kahjustavad ühiskonnale olulisi ressursse nagu puit. Ohtliku juuremädaniku tekitaja, juurepessu (*Heterobasidion* spp.) põhjustatud majandusliku kahju suuruseks on Euroopas hinnatud ligikaudu 800 miljonit eurot aastas (Asiegbu jt 2005). Juurepess kahjustab Eestis majanduslikult tähtsaid puuliike, harilikku mändi (*Pinus sylvestris*) ja harilikku kuuske (*Picea abies*), tekitades puidus valgemädanikku (Butin 1995). Harilik mänd on Eestis enamlevinum puuliik, moodustades kogu metsade pindalast 32,9%, ning harilik kuusk on samuti laialt levinud, puuliik moodustades meie metsade pindalast 16,2% (Aastaraamat mets 2014). Arvestades männi- ja kuusepuistute olulisust Eesti metsades, on tähtis uurida antud puistuid kahjustavaid seeneliike. Hiljutiste uurimuste tulemusena on leitud (Drenkhan jt 2014), et juuremädanike levik on Eestis seni arvatust ulatuslikum, mistõttu tuleb veelgi enam analüüsida juurepessu leviku dünaamikat, et hinnata patogeeni sekundaarse leviku (sh levik puujuurte kaudu) tähtsust okaspuupuistutes.

Seniseid juuremädanike uuringud on näidanud Eesti kuuskede halvemat tervislikku seisundit võrreldes männikutega, mistõttu käesoleva töö põhihüpoteesiks pöö, et kuuseenamusega puistute mullas on suurem seenpatogeenide osakaal kui männikutes. Teiseks töö hüpoteesiks oli, et juuremädanike suurem osakaal tõuseb raietejärgsel aastal võrreldes kontrollalaga, kuna juurepessu eosed nakatavad värsked kändusid ning raiete käigus vigastatud juuri.

Raiete järgselt muutub mulla mikrokliima, sellega seoses oletatakse, et ka seenetaksonite ja isendite rohkus ja arvukus peale raieid muutub (Bendz-Hellgren, Stenlid 1998, Tedersoo 2007). Raiatud ja raiumata puistute seenetaksonite võrdlusel, võttes arvesse mitmeid parameetreid nagu näiteks puistu koosseis ja kasvukohatüüp, on võimalik anda hinnanguid mullas levivate seente liigirikkusele ja dünaamikale. Magistritöö põhieesmärk oli hinnata viljakates kasvukohatüüpides männikute ja kuusikute mullas seenetaksonite koosseisu mullas. Töö käigus analüüsiti seenetaksonite koosseisu kahel järjestikusel aastal uuendusraie järgselt ning võrreldi seenpatogeenide dünaamikat. Töös keskenduti peamiselt juuremädanike tekitajate väljaselgitamisele.

Töö esimeses osas antakse ülevaade juuremädanike tekitajate levikust nja kahjustustest ning nende omavahelistest seostest, võrreldakse peamiste juuremädanike tekitajate (külmasene ja juurepessu) esinemist uuendusraie järgsel kahel aastal. Kirjeldatakse ka teiste patogeensete seente olemasolu ning rohkest metsamullas. Materjali ja meetodika osas kirjeldatakse katsealasid ning mullaproovide kogumise meetodikat, läbiviidud väli- ja ja labortöid ning tutvustatakse andmete analüüsi.

Kokku koguti proove sajast puistust: 50 okaspuuenamusega uuendusraiealalt ning nendega raiesmikega piirnevalt 50 kontrollalalt ehk sarnase koosseisuga raiumata puistust. Mullanalüüsil kasutati Illumina sekveneerimist ehk nn. mass-sekveneerimist, mis võimaldab mullast proovist tuvastada kõikide elusorganismide DNA.

Magistritöö teostati RMK projekti „Metsakultiveerimisega seotud metsakaitseprobleemid Eesti metsanduses ning nende vältimine keskkonnasäästlike tõrjevõtetega“ (2012–2015) raames.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Seenetaksonid Eestis

Maailmas on kirjeldatud veidi alla 100 000 seeneliigi (Tabel 1). Kaasaegne molekulaarne meetodika on võimaldanud uurida tegelikku seeneliikide rohkest ning uuringute tulemusel võib seeneliikide rohkus ulatuda kuni 5,1 miljoni liigini (Blackwell 2011). Eestis on seni määratud 7392 seeneliiki (Saar 2015).

**Tabel 1.** Seente hõimkonnad ning nende liikide arv (Saar 2015 järgi)

Seenehõimkond	Seeneliikide arv Eestis	Seeneliikide arv maailmas
<i>Rozellomycota</i>	teadmata	umbes 24
Pisieossed, <i>Microsporidia</i>	teadmata	> 1300
Viburseened, <i>Chytridiomycota</i>	16	706
Vatsaviburseened, <i>Neovallimastigomycota</i>	teadmata	20
Jõnksviburseened, <i>Blastocladiomycota</i>	4	179
Ikkeseened, <i>Zygomycota</i>	50	1065
Krohmseened, <i>Glomeromycota</i>	70	169
Kottseened, <i>Ascomycota</i>	4022	64 163
Kandseened, <i>Basidiomycota</i>	3230	31 515
<b>Kokku</b>	<b>7392</b>	<b>&gt; 99 200</b>

## 1.2. Okaspuudel esinevad seenpatogeenid

Juuremädanike kõrval esineb okaspuudel veel hulganisti haigusetekiitajaid, millest mõned on ka epideemilised ja karantiinsed.

Punavöötaudi tekitab kottseen *Dothistroma septosporum*, mis levib Euroopas peamiselt suguta arengujärgus eoste abil (Hanso, Drenkhan 2008b). Punavöötaud kahjustab peamiselt noori

mände. Haiguse varajaseks sümptomitks on nekrootilised võõdid, mis värvuvad hiljem punaseks (Pehl *et al.* 2015). Okkad varisevad, kuni puule jäävad vaid viimase aasta okkad, mistõttu võivad teised biotilised ja abiotilised kahjustajad puu surmata.

*Lecanosticta acicola* on *D. septosporum*'ile sarnane kottseen, mis tekitab okkahaigust pruunvöötaud. Pruunvöötaudiga nakatunud okastele tekivad aja jooksul pruunid võõdid, haiguse tagajärjel männi okkad varisevad ning puu kasv aeglustub (OEPP/EPPO 2015). Pruunvöötaud on Euroopas arvatud karantiinsete haiguste hulka (Drenkhan, Adamson 2013). *Diplodia sapinea* on samuti männi võrse- ja okkahaigus, mis muudab okkad hallikaks ning kasvult enam kui poole lühemaks. Patogeen nakatab nii okkaid, käbisid, kui ka võrseid (Drenkhan, Adamson 2013). Männi pudetõbe tekitab *Lophodermium seeditiosum* (Hanso, Drenkhan 2008b), haigus on puhanguline ning ohtlik noortele mändidele (Drenkhan, Adamson 2013). Pärast patogeeni rünnakut okkad varisevad.

Kõige olulisemad Eesti metsade kahjustajad on aga juuremädanikku tekitavad juurepessu ja külmaseene perekonda kuuluvad patogeenid (Hanso, Hanso 1999b).

### 1.2.1. Juurepess

Eestis on leitud kaks juurepessu liiki – männi-juurepess (*Heterobasidion annosum*) ja kuuse-juurepess (*H. parviporum*) – peremeestaimedeks valdavalt harilik mänd ja harilik kuusk. Kuuskedel esineb lisaks kuuse-juurepessule ka männi-juurepessu, mändidelt on kuuse-juurepess tüve tuvastatud varasemalt harva (Drenkhan jt 2014). Juurepessu viljakehad moodustuvad puu juurekaelal ning juurtel, kändudel ja lamapuidul lamapuidul (Redfern, Stenlid 1998).

Juurepess on levinud põhja-paravöötme metsades, aga ka mõnel pool troopilistel aladel (Smith jt 1988). Patogeen tekitab Euroopas ja Põhja-Ameerikas okaspuudele tõsist majanduslikku kahju, mändide suremuse tagajärjel võib raiemahu kadu olla kuni 20 % (Smith jt 1988). Kuusikutes võib juurepessu nakkus tekitada eriti ulatuslikku kahju, kuna pinnalähedase juurestiku tõttu on suurenenud tuuleheite oht, ning erinevalt männist, võib kuusel mädanik tõusta kuni 12 m kõrgusele (Swedjemark, Stenlid 2001), mis tähendab väärtusliku raiesortimendi kadu.



Patogeen levib hästi viljakates kasvukohatüüpides (Hanso, Hanso 1999; Drenkhan jt 2014), ning juurepess peaaegu puudub jämeda turbakihiga kasvukohatüüpides (Mattila, Nuutinen 2007). Lõuna-Soome hariliku kuuse puistutest kogutud andmetel leiti, et juurepessu kahjustuse tõenäosus viljakates kasvukohatüüpides kasvab temperatuuri tõusuga, väheneb aga puistu kõrguse tõustes merepinnast (Mattila, Nuutinen 2007).

### **1.2.2. Külmaseen**

Juurepessu järel teiseks väga oluliseks juuremädanikku tekitavaks seenhaiguseks on külmaseen. Euroopas peetakse mõningaid külmaseene liike tugevateks puitulagundavateks patogeenideks (Lushaj jt 2009). Külmaseene risomorfid võivad levida mullas mitmete meetrite kaugusele kuid kahjustamata seni kui mõni puu ei suuda seenhaigusele enam piisavalt vastupanu osutada ning nakatub (Hanso, Hanso 1999a).

Juurepessu kõrval on teiseks oluliseks juuremädaniku tekitajaks külmaseen, Eestist on leitud 5 külmaseene liiki, neist kõige patogeensem eelkõige okaspuudele on tõmmu-külmaseen (Garbletto, Gonthier 2013).

Tõmmu külmaseen nakatab enamasti kännu alumise osa välimist puidukudet, juurepess levib pigem tsentraalses osas. Külmaseen võib seega vähendada juurepessu nakkuse levikut kännu kõrvalolevatele tervetele puudele.

### **1.3. Raiete mõju juuremädanike teitajatele**

Juuremädanike levikut metsas soodustavad raied, mis tekitavad seeneeoste kasvuks sobilikke substraate kändude ja puude tüvele tekitatud vigastuste näol. Raietejärgselt on kännud juurepessu nakkusele vastuvõtlikud, kui pikka aega haigus kändude kaudu levida võib on varieeruv, ning sõltub puuliigist, aastaajast, metsatüübist ja teistest mikroorganismidest (antagonistid). Juurepess levikukiirus kännult juurtesse on kuni 20 cm kuus, olenevalt puuliigist ja ilmastikust (Garbletto, Gonthier 2013). Sitka kuuse (*Picea sitchensis*) kändude nakatamise katses leiti, et juurepessu nakkusele olid kännud kõige vastuvõtlikumad 48 tunni jooksul peale

raiet. Vahetult peale raiet ning 1 päev peale raiet koloniseerisid kände kandeosed lüli- ja maltspuidus suurel alal ja korrapäratult, või siis ulatuslikult lülipuidu osas. Seitse päeva peale raiet esinesid juurepessu kolooniad vaid lülipuidu osas ning märgatavalt väiksemal pindalal. 28 päeva peale raiet esinesid üksikud kolooniad lülipuidus väga väikesel alal, või siis puudusid üldse (Woods jt. 2000).

Juurepessu levik sõltub ka aastaajast millal raie on teostatud. Arvatakse, et miinuskraadidega juurepessu eosed ei levi (Hanso ja Hanso 1999), kuid on ka vastupidiseid tulemusi. Garbletto jt. (2010) uurimuses tuvastati talvisel ajal tehtud raiete järel oluliselt kõrgem nakkustase kui suvise raie järel. Juurepessu levikut uuriti harvendusraiate järgsetes puistutes ning sarnaselt eelnevalt mainitud uurimustulemustele, tuvastati talvel raiutud puistutes enam juurepessu kui suvel raiutud puistutes (Rähn 2014). Nakatumine sõltub siiski suuresti puuliigist, ilmastikust ja ökoloogilistest teguritest.

Arvatakse, et üldine liigirikkuse kadumine peale lageraieid võib ektomükoriisat moodustavatele seenekooslustele negatiivselt mõjuda (Byrd jt. 2000), mis võib omakorda soodustada juurepessu levikut, kui puud sümbiontsed seeneliigid ei kaitse. Juurepess võib otse eostega nakatada ka elusat puud, tõenäoliselt juurevigastuste kaudu (Roll-Hansen, Roll-Hansen 1981), aga nakatumine sellel teel on väheoluline (Rönnerberg ja Jørgensen 2000).

Raietejärgselt muutunud metsamuld on erinevates kasvukohatüüpides varieeruv. Arvatakse, et üldine liigirikkuse kadumine peale lageraieid võib ektomükoriisat moodustavatele seenekooslustele negatiivselt mõjuda (Byrd jt 2000).

## **2. Materjal ja metoodika**

### **2.1. Katsealad ja mullaproovide kogumine**

Magistritöö andmed on kogutud 50 okaspuu enamusega lageraiealalt ning 50 sarnase koosseisuga raiumata puistust e. kontrollalalt. Nendest 25 ala olid kuuseenamusega ja 25 männienamusega uuendusraielangid (töös edaspidi raiesmik) ning sama paljudelt kontrollaladelt (samuti 25+25 puistut). Joonisel 1 on punasega tähistatud männienamusega alad ning rohelisega kuuseenamusega alad. Kontrollalad asusid raiesmiku vahetus läheduses või umbes 100–200 m kaugusel. Puistud valiti hariliku kuuse ja hariliku männi enamusega (okaspuu osakaal vähemalt 50% puistu koosseisust) puistute hulgast. Raiesmikud ja kontrollalad paiknesid viljakates kasvukohatüüpides, neist kuusikud jänesekapsa, naadi ja sinilille kasvukohatüübis ning männikud jänesekapsa, jänesekapsa-pohla, pohla ja pohlamustika kasvukohatüübis. Valdav osa puistuid raiuti 2013. aasta varakevadel.

Mullaproove koguti kaheksast Eesti maakonnast (joonis 1), neist 16 prooviala asusid Põlvamaal, 15 Tartumaal, 6 Võrumaal, 4 Valgamaal, 4 Harjumaal, 3 Ida-Virumaal, 1 Lääne-Virumaal ja 1 Jõgevamaal.



kauguselt, s.o kokku 40 mullaproovi ühe ala kohta. Proovivõtu kohalt eemaldati lehed ja oksad. Mullaproovide kogumiseks kasutati spetsiaalset mullapuuri läbimõõduga 5cm, puur suruti 7-8 cm sügavusele mulda, et proov sisaldaks mulla orgaanilist kui ka pealmist mineraalkihti. See on oluline, kuna suurem osa seentest elutseb mulla ülemises osas (Tedersoo jt 2014). Ühelt alalt kogutud muld pandi ühte kilekotti (raiesmik ja kontrollala eraldi), saadud mullaproovist eemaldati jämedad juured ja kivid. Kott tähistati puistu kohta käiva informatsiooniga (kvartal, eraldis, kuupäev, puistu koosseis). Raiesmikel täpsustati vajadusel kasvukohatüüp. Saastumise vältimiseks kasutati mulla kogumisel puhtaid ja steriilseid ühekordseid kindaid.

Mädaniku esinemist hinnati vähemalt 20 juhuslikult valitud kännul ühe ala kohta (kännud kattusid osaliselt nende kändudega, mille juurest koguti mulda), et hinnata mädaniku esinemise protsent raiesmikul puuliigiti. Kontrollaladelt koguti mullaproov sarnaselt raiesmikule, kuid kasvavate puude kõrvalt juurekaela lähedalt (1-1,5 m) ja ühe ala kohta koguti mulda 20 puu kõrvalt. Määrati ka puistu koosseis ja vajadusel täpsustati kasvukohatüüp.

Kogutud mullaproove kuivatati toatemperatuuril Eesti Maaülikooli metsapatoloogia laboris vähemalt 30 päeva kuni kuivad mullaproovid olid valmis edasiseks DNA eraldamiseks ja PCR analüüsideks.

## **2.3. Labortööd**

### **2.3.1. Molekulaarne metoodika seenetaksonite määramiseks**

Kuiva mulda valmistas autor molekulaaranalüüsideks ette Eesti Maaülikooli metsapatoloogia laboris 2013. ja 2014. aasta suve teises pooles. Mulla eeltötlus (mullaproovi peenestamine) DNA eraldamise jaoks teostati steriilsetes tingimustes. Kaalutavast mullamaterjalist eemaldati kogu orgaaniline materjal ja kivid. Muld kaaluti (2 g) ning kallati eelnevalt märgistatud DNA eraldamise jaoks ettenähtud 50 ml tuubidesse, mis sisaldas roostevabast terasest kuule mulla purustamiseks. Mulla purustamine toimus Vortex Genie-2 + SI-H506 Horizontal 50ml Tube Holder'il. Töö ajal kasutati steriilseid kindaid, mis iga kaalumise järel piiritusega steriliseeriti. DNA analüüsidesid järelejäänud mullaproove säilitatakse Eesti Maaülikooli metsapatoloogia laboris.

Kaalutud mullaproovid olid valmis DNA eraldamiseks, mida teostati Tartu Ülikooli mükoloogia õppetooli molekulaarlaboris 2014 ja 2015 aasta talveperioodil. DNA eraldamiseks kasutati "MOBIO" PowerMax Soil DNA Isolation Kit'i (MO BIO laboratoires, Inc, Carlsbad, California, USA), järgides tootjapoolset protokollit. Eraldatud DNA-d säilitati – 20 °C sügavkülmas kuni PCR analüüsideni ja sekveneerimiseni.

### ***2.3.2. PCR ja sekveneerimine***

PCR temperatuuritsükleid teostati masinatega Eppendorf 5341 ja 6321 (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). Kokku tehti kõikide proovide puhul läbi 30 PCR tsüklit. PCR reaktsioonisegu oli kokku 25 µl, reaktsioonisegu sisaldas 18 µl vett, 5 µl 5x HOT FIREPol Blend Mastermix (10 mM MgCl<sub>2</sub>) (OÜ Solis Biodyne, Tartu, Eesti), 0,5 µl mõlemat praimerit (20 pmol) ja 1 µl DNA-d. Esmane denatureerimine viidi läbi temperatuuril 95 °C 15 min jooksul. Sellele järgnesid korduvad tsüklid, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 95 °C 30 s jooksul, (universaalpraimerid) gITS7 ja ITS4ngs praimerite (Ihrmark jt. 2012) seondumisest 30 s jooksul temperatuuril 55°C ja elongatsioonist (nukleotiidi ahela pikenedamine) temperatuuril 72 °C 1 min kestel. PCR tsüklid lõpetas pikk elongatsiooni etapp temperatuuril 72 °C, mis kestis 10 min. PCR produktid (5 µl) separeeriti geelelektroforeesil 1% agarosgeelil (SeaKem LE Agarose, Lonza Group Ltd, Basel, Šveits) 1% TBE puhvril 15 min. Geeli jooksutati Biometra Compact M elektroforeesisüsteemis (Biometra GmbH, Goettingen, Saksamaa) voolupingega 10 V/cm. PCR produktid markeeriti etiidiumbromiidiga (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) ja visualiseeriti UV valguses kasutades Bio-Vision 3026 WL süsteemi (Vilber Lourmet, Torcy, Prantsusmaa). Proovid, mille puhul geelil puudus või oli väga nõrk, amplifitseeriti uuesti ja teostati 35 PCR tsüklit ning proovidel, millel oli geelivõõd väga tugev, teostati 25 PCR tsüklit. PCR reaktsioonide kvaliteedi kontrollimiseks kasutati positiivset ja negatiivset kontrollit.

PCR produktid puhastati SequalPrep Normalization Plate (96) kiti (Invitrogen, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA) kasutades. Igat PCR produkti võeti 25 µl ja pipeteeriti SequalPrep normalisatsiooni plaadile. Võrdses koguses lisati SequalPrep seondumis puhvrit (SequalPrep Normalization Binding buffer). Seejärel kaeti plaat PureLink tihendus teibiga (PureLink Foil Tape, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA) ning

segati Vortexil ja tsentrifuugiti paari sekundi vältel kiirusel 3000 pööret minutis tsentrifuugil Eppendorf 5424 (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). Seejärel inkubeeriti tund aega toatemperatuuril ning võimaldati DNA-l plaadi pinnale seonduda. Järgnes pesuetapp, mille käigus vedelik aspireeriti geelivahedesse ettevaatlikult, et mitte selle külgi puutada. Lisati 50µl pesupuhvrit (SequalPrep Wash Buffer) geelivahedesse ja pipeteeriti ettevaatlikult üles ja alla, et eemaldada üleliigne osa. Pesupuhver eemaldati samuti aspireerimise teel ning allesjäänud vedelik eemaldati plaadi õrna koputamise teel filterpaberile. Järgnes elueerimise etapp, kus agarosgeelivahesse lisati 20 µl elueerimise puhvrit (SequalPrep Normalization Elution Buffer). Kuni viis korda pipeteeriti puhvrit üles-alla, kaeti uuesti PureLink katte teibiga, segati vortexil ja tsentrifuugiti lühikest aega. Seejärel inkubeeriti toatemperatuuril 5 min. Mõlemalt plaadilt võetud proovid lisati kahte 1,5 ml tuubi. Enne sekveneerimist sadestati proovid välja etanoolis, kasutades Pellet Paint (Novagen, Merck, Darmsdat, Saksamaa) värvi. Protseduur teostati vastavalt tootja protokollile. Enne sekveneerimist mõõdeti üle DNA kontsentratsioon, kasutades fluoromeetrit Qubit 2.0 fluoromeetrit ja Qubit dsDNA BR kaheaahelalise DNA kontsentratsiooni mõõtmise süsteemi (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, CA, USA).

### **2.3.2. Bioinformaatiline analüüs**

Käesoleva magistritöö molekulaarne ja bioinformaatika analüüs on läbi viidud sarnaselt Tedersoo jt (2015) metoodikale. PCR produktide sekveneerimine viidi läbi TÜ Eesti Geenivaramu tuumiklaboris. Sekveneerimiseks kasutati Illumina Miseq (2×300 bp), mille tulemuseks saadud järjestusi sisaldavad failid edastati lauarvutisse fastq formaadis. Fastq failides toimus esmane järjestuste arvu määramine ja andmete kvaliteedikontroll programmis mothur 1.34.4 (Schloss jt 2009) (keskmine kvaliteet = 30 üle 15 aluspaari). Kõik sekventsids, mis sisaldasid ebaselge signaaliga nukleotiide, eemaldati. Seejärel ühendati sekveneerimisandmed, kasutades programmi PANDAseq Assembler (Masella *et al.*, 2012) (kattuvuse miinimumiks = 15 aluspaari). Sekventsids jagati proovidesse molekulaarsete identifitseerijate (MID) alusel kasutades programmi mothur. Saadud sekventsidses praimerite järjestused kustutati.

Potentsiaalsed kimäärid eemaldati kasutades programmi usearch 7.0.1090 (Edgar 2010) (*de novo* kimäärkontroll + UNITE andmebaasi vastu kimäärkontroll). Bioinformaatika programm ei võimaldanud kõiki vigaseid üksuseid kustutada ning seda tehti hiljem käsitsi. Artefaktsed

järjestused, mis sisaldasid praimerite järjestusi kusagil sekvensi keskel, eemaldati, kasutades Unix'i käskke. Täispiikad ITS2 järjestused (ilma külgnevate 5.8S ja 28S geenideta) eraldati programmis ITSx 1.0.11 (Bengtsson-Palme jt., 2013). ITS2 järjestused määrati taksonoomilisteks üksusteks (OTU'deks) 97% sarnasuse alusel kasutades programmi CD-HIT. Taksonoomiliste üksuste esindussekvensid valiti programmis mothur (meetod = *abundance*).

Esindussekvensidega BLASTn otsing teostati INSD ja UNITE andmebaasidega. Leiti 88976 OTU't, millest 82417 olid seeneriigist. 413 neist osutusid kimäärseks ning eemaldati andmestikust. Saadud andmebaasi tuli sorteerida ja täiendada, ning võimalikke vigaseid OTU'sid INSD andmebaasist kontrollida ja andmestikust eemaldada. Andmestikku töödeldi programmis Excel. Mulla DNA proovid töödeldi praimerisegudega, mis fikseerivad lisaks seente DNA-le paljude teiste organismide DNA, seega tuli välja sorteerida ning eemaldada organismid teistest rühmadest, nt taimed, ainuraksed ja loomad. Iga OTU määrati taksonoomilise üksuseni (liik, perekond, sugukond, selts, hõimkond), võttes kriteeriumiks sekvensi identsuse protsendi (vastavalt 90, 85, 80, 75). Seejärel täiendati OTU'sid geenipanga kümne parima vaste järgi. Oluliste seeneliikide otsing teostati käsitsi.

## 2.4. Statistiline analüüs

Juuremädanike osakaal arvatati välja jagades patogeeni sekvenside arv kogu ala sekvenside arvuga s.o juuremädaniku tekitaja proportsioon kõikide sekvenside suhtes. Analüüsis kasutati 23 kuusiku ning 17 männiku andmeid, 2 kuusiku ning 8 männiku puhul tekkis DNA-eraldamisel või sekveneerimisel viga. Nimetatud vigastele proovidele on võimalik tulevikus uued analüüsid teha ning tulemused olemasolevatele andmetele lisada.

Leidmaks erinevust juurepessu ja külmasene esinemise kohta kahel järjestikusel aastal kasutati R keskkonnas dispersioonanalüüsi meetodit funktsiooniga *lm* (Fox 2011). Võrdlused tehti juurepessu ja külmasene esinemise kohta kuusikutes ja männikutes, raiesmikel ning kontrollaladel kahel järjestikusel aastal.

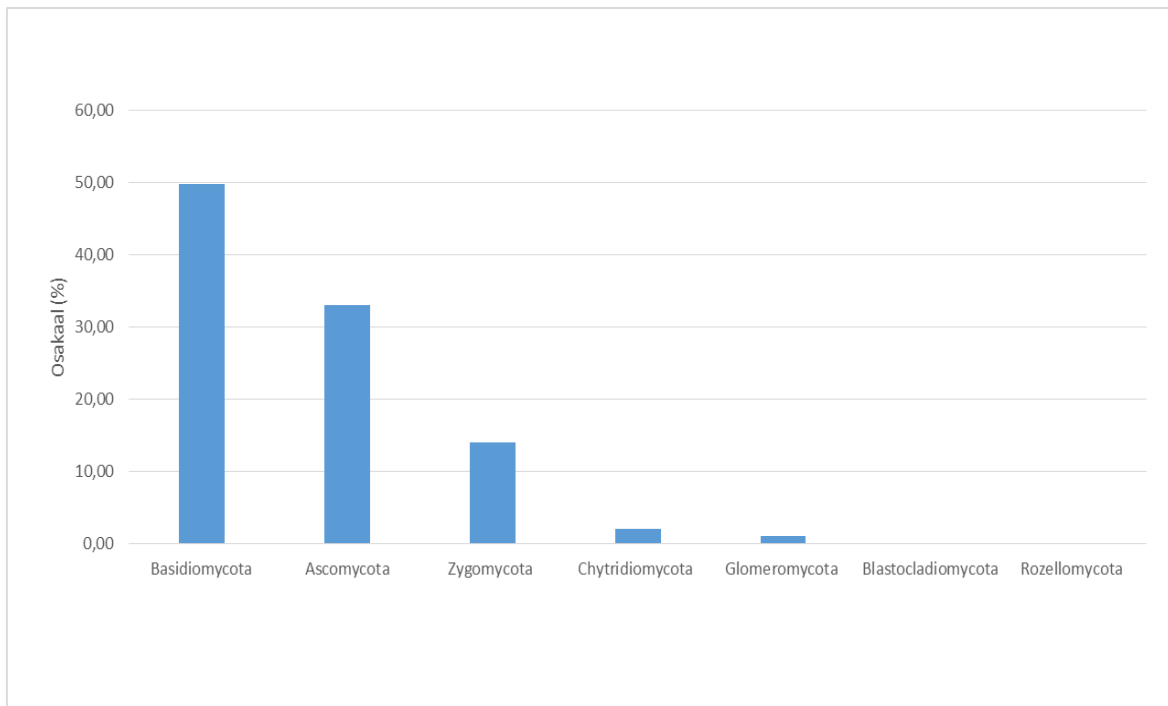


### 3. Tulemused ja arutelu

#### 3.1. Ülevaade määratud seenetaksonitest

Mullaproovidest tuvastati kokku 88976 taksonoomilist üksust (OTU), neist 82004 seeneriigist. Organisme leiti veel rühmadest Alveolates, Amoebozoa, Bacillariophyta, Brownalgae, Bryophytes, Eustigmatophytes, Greenalgae, Liverworts, Metazoa, Oomycetes, Redalgae, Rhizaria, Synurophyceae ja Tracheophyta.

Liigitasemeni õnnestus määrata 6670 OTU't ning perekonnani 36 679 OTU't. Liike määrati kahe aasta proovide ja alade (raiesmik ja kontrollala) peale kokku 1270, mis on ca 17% Eestist leitud seeneliikidest (Eestis on teadaolevalt 7392 seeneliiki). Joonisel 2 on esitatud seene hõimkondade osakaalud analüüsitud mullaproovidest raiesmikelt ja kontrollaladelt kokku. Kõige enam tuvastati analüüsitud muldadest seeni hõimkonnast Basidiomycota (kandseened) ja Ascomycota (kottseened). Rühma Zygomycota ehk ikkeseeni määrati 14 % proovidest määratud seentest, hõimkond Chytridiomycota (viburseened) moodustas 2 %. Glomeromycota ehk krohmseeni esines 1 % ning Blastocladiomycota (jõnksviburseened) ja Rozellomycota taksoneid 0,01 %. Rozellomycota on hiljuti kirjeldatud hõimkond ning andmed selle liigilise koosseisu kohta Eestis on teadmata (Saar 2015), töös kasutatavast andmestikust õnnestus tuvastada üks liik – *Paramicrosporidium saccamoebae*.



**Joonis 2.** Analüüsitud seenehõimkondade osakaal raiesmikelt ning kontrollaladel 2013. ja 2014. aastal kokku

### 3.2. Juuremädanike tekitajad

Üks olulisemaid töö eesmärke oli uurida lähemalt olulisemate juuremädanike esinemist metsamullas, s.o eelkõige juurepess (*Heterobasidion*) ja külmaseen (*Armillaria*). Perekonna *Heterobasidion* taksonoomilisi üksusi leiti neli, neist üks olid määratud ka liigini – *H. annosum*, mis leiti kaheksas männikus ning kuues kuusikus. Mändidelt pole senini veel kuuse-juurepessu tüve leitud, seega on männi katsealadel mädaniku esinemise korral tegemist pigem männi-juurepessuga, kuuskedelt on männi-juurepessu tüve leitud sagedamini (Drenkhan *et al.* 2014). Mida enam suureneb männikus kuuse osakaal, seda enam võib männikust juurepessu nakkust leida. Tabelid 2, 3 ja 4 kirjeldavad juurepessu ja külmaseene osakaalu männikutes ja kuusikutes, arvestades puistute liigilist koosseisus raiesmikelt ning kontrollaladel ja kasvukohatüpe. Kasvukohatüüp raiesmikelt ja kontrollaladel oli valdavalt sama, erinemise korral on tulbas „Kkt“ (kasvukohatüüp) eraldatud kaldkriipsuga (raiesmiku kkt/kontrollala kkt). Väikse osakaaluga e. alla 10 % jäävad puuliigid katsealade koosseisudes märgiti tabelitesse plussi järel.

Analüüsitud 22-st kuusikust tuvastati juurepessu esinemine 16 raiesmikul mullaproovist, ning 14 kontrollpuistus. Kuuel raiesmikul (SK260\_7; SV055\_13; PE177\_5,6; TR164\_4; KM112\_24; QT030\_11) tuvastati juurepess mõlemal aastal, neist neljal (SV055\_13; PE177\_5,6; TR164\_4; KM112\_24) oli juurepessu osakaal teisel proovivõtu aastal peale raiet kasvanud ning teistel juhtudel jäi osakaal samaks (Tabel 2).

Viiel raiesmikul ei tuvastatud juurepessu teise aasta proovidest, kuigi seen esimesel aastal esines, selle põhjus võib olla antagonistide esinemine mullas, mis patogeeni levikut võisid pärssida. Oluline juurepessu antagonist on hiidkoorik (*Phlebiopsis gigantea*), mille baasil on välja töötatud ka biopreparaat Rotstop® (Thor 2005). On teada, et seened perekondadest *Trichoderma* ja *Penicillium* mõjuvad juurepessule antagonistidena ning nende liikide vähesuse korral mullas, on juurepessu levik edukam (Korhonen, Stenlid 1998; Stenlid, Redfern, 1998). Illumina sekveneerimise tulemustes oli esindatud paljulooduslikult levinud antagonistide taksonid ning edaspidi analüüsitakse põhjalikult nende mõju juurepessu esinemisele. Hiidkooriku DNA-d mullaproovidest ei leitud, kuid see ei kinnita selle puudumist, sest antud uurimuses puiduproove kändudest ei analüüsitud. Probleem võib olla ka meetoodiline, kus nimetatud proovide analüüsis võis esineda vigu. Käesoleva töö tulemusena ühtselt selgeid seaduspärasusi juuremädaniku esinemise dünaamika kohta kahel järjestikusel aastal ei ole.

Kõige enam esines juurepessu jänesekapsa kasvukohatüübis kuusikutes. Sinilille kasvukohatüübi kuusikud, mida on peetud Eestis juurepessu poolt kõige enam kahjustatuks ning patogeenile vastuvõtlikumaks (Drenkhan 2014, Hanso ja Hanso 1999), ei olnud töö tulemusel juurepessuga oluliselt nakatunud alad (RK034\_10; KM106\_14) või puudus nakkus täielikult (PE070\_6).

**Tabel 2.** Juurepessu osakaal kuuse enamusega raiesmikel ja kontrollaladel kahel järjestikusel aastal kogutud mullaproovide tulemusena

Katseala kvartal ja eraldis	Juurepessu osakaal (%)				Puistu koosseis		Kkt (raiesmik/ kontrollala)
	Raiesmik 2013	Raiesmik 2014	Kontrollala 2013	Kontrollala 2014	Raiesmik	Kontrollala	
SK260_7	1,5	1,2	0	0,8	70KU 30KS + RE, HB	90KU 10KS	ND
SV055_13	2,3	12,7	1,3	0	90KU 10MA +KS	70KU 20MA 10KS	JK
VL652_18	0	1,8	0	0,9	60KU 40KS	50KU 50MA +KS	JK
EV090_1	1,1	0	0	0	100KU	100KU	JK
RS138_6,7	1,6	0	0,8	0,5	60KU 30MA 10KS	60KU 30MA 10KS	JK
SV109_32	2,1	0	0	1,2	80KU 10KS 10HB	90KU 10HB	JK
VL579_9	1,9	0	0	0,3	50KU 30HB 10MA 10TM +KS	40KU 30HB 20LV 10KS	JK
PE070_9	0	0,9	0	0	100 KU	100 KU	JK-ND
PE070_6	0	0	0	0	70KU 20HB 10KS	50KU 40HB 10KS	SL
VL652_11	0	0	0	0,3	90KU 10HB +KS	60KU 40MA +KS	JK
JS253_3	0	0	0	0,2	50KU 30KS 20HB +MA	40KU 30KS 20HB 10MA	JK
SV150_5	0	2,1	7,4	0,9	100 KU	100 KU	JK
PE177_5,6	1,4	5,8	0	0	70KU 30MA	70MA 30KU	ND
MO067_21	0	0	0	0	70KU 20MA 10KS	70KU 20MA 10KS	ND / JK
TT095_5	0	0	0	0,4	90KU 10HB	100 KU	JK
RK034_10	0	0,4	0	0	80KU 20KS +HB, MA	50KU 40MA 10KS	SL
TR164_4	1,4	7,3	3,6	0	60KU 40MA	80MA 20KU	JK
JS254_5	0	0	0	0,8	70KU 20 KS 10HB	50KU 50KS	MS
KM112_24	1,3	4,2	0	0,1	60KU 40MA + LV, SA, RE	70KU 20MA 10KS	JK
QT095_5	1,2	0	1,2	0	70KU 20MA 10KS	70MA 20KU 10KS	JK
QT030_11	10,3	2,2	5,2	3,6	70KU 20MA 10KS +LV	60MA 40KU	JK
KM106_14	2	0	0	1,1	80KU 10MA 10KS +PN	50KU 30KS 20MA	SL

Kuusikute katsealadel KM112\_24; QT095\_5; QT030\_11; SV055\_13; EV090\_1; RS138\_6,7 leiti männi-juurepessu nakkus. Ala QT030\_11 vahetus läheduses kontrollalala puistus on männi osakaal puistus suurem. See võib olla võimalikuks männi-juurepessu suuremaks esinemise tõenäosuseks raiesmikul. Ala QT030\_11 esimese aasta proovides on juurepessu osakaal võrreldes teiste aladega suur, nagu ka alal SV055\_13 ning mõlemad on männi-juurepessu nakkusega.

Männi raiesmikelt määrati juurepessu esinemine 18-st alast üheksal ehk pooltel. Neljal raiesmikul puudus juurepess sootuks, kuid kontrollaladel (VJ109; KJ114\_16; KJ096\_1; RP039\_9) patogeeni siiski esines (Tabel 3). Üks aasta peale raiet on juurepessu osakaal kõige enam tõusnud alal KJ041\_1 (36 %), samas kontrollalal haigustekitajat ei leitud. Puistu liigiline koosseis männi raiesmikel ja kontrollaladel ei ole mõjutanud juurepessu esinemist ja selle osakaalu oluliselt.

**Tabel 3.** Juurepessu osakaal männi enamusega raiesmikel ja kontrollaladel kahel järjestikusel aastal kogutud mullaproovide tulemusena

Katseala kvartal ja eraldis	Juurepessu osakaal (%)				Puistu koosseis		Kkt (raiesmik/kontrollala)
	Raiesmik 2013	Raiesmik 2014	Kontrollala 2013	Kontrollala 2014	Raiesmik	Kontrollala	
RP039A_7	0	1,1	3,6	0	90MA 10KU	100MA +KU	JK-PH
KJ095	0	2,1	0	1,5	90MA 10KU +LV	100MA +KU	PH
SA138_10	3,4	1,3	0	0,7	100MA +KU, VA, LV, RE, KS	70MA 30KU	SL
TL096_16	0	0	0	0	100MA	100MA	PH
TH162_2	0,5	0	1,4	0	100MA	100MA	JP
IM132_6,9	1,9	0	3,1	1,1	100MA +KU, KS	100MA +KU	JP
VJ109	0	0	0	0,2	100MA +KS	100MA +KS, KU	PH
KJ041_1	0,9	24,7	0	0	90MA 10KU	100MA +KU	PH
KJ114_16	0	0	0	1,8	60MA 40KU +HB, KS	90MA 10KU	JK/JK-PH
QB159_2	0	0	0	0	100MA +KS, KU	100MA	PH
QT100_3	0	2,9	5	0,4	40MA 30KU 30KS	60MA 40KU +KS	JK-SL
HL378_5	0,4	0	0	0	100MA +KU	100MA +KU	PH-MS

QT103_24	0	0	0	0	100MA	100MA	PH-MS
QT099_12	0	0	0	0	100MA +KU, KS	100MA +KU	PH / PH-MS
JS262_4	2,8	2	0	0	80MA 10KU 10KS	90MA 10KU +KS	MS
KJ096_1	0	0	7,2	7,1	60MA 40KU +HB, KS	70MA 30KU	PH
QB060_8	0	0	0	0	100MA +KS	100MA	PH
RP039_9	0	0	1,7	1	90MA 10KS	100MA +KS	PH

Illumina sekveneerimine ei ole juurepessu täpseks liigi tuvastamiseks kõige parem meetod, seda tõestab asjaolu, et kontrollaladel elutsev juurepess, mida lähedalasuvatelt raiesmikelt ei leitud, võib seal siiski levida – kirjanduse andmetel võib üksainus juurepessu kloon levida 50 m raadiuses ning tekitada uusi haiguskoldeid (Asiegbu 2005). Samuti leiti paljudel aladel juurepess esimesel aastal, kuid järgmise aasta proovidest haigust ei tuvastatud, kännud on aga juurepessule soodne viis levimiseks ning peale ühte aastat peaks isendeid mullas rohkem olema, lisaks võib haigusetekitaja mullas mitmeid põlvkondi elutseda (Asiegbu 2005). Kändude visuaalsel hindamisel leiti mädaniku olemasolu peaaegu kõikidest kuusikutest ja männikutest (Tabelid 6 ja 7), mis ei pruugi olla 100 % põhjustatud ainult juurepessust.

Külmaseene perekonna OTU'sid tuvastati 31, kuid seene osakaal katsealadel on üsna väike. Kaks OTU't õnnestus liigini määrata – *A. solidipes* (varem *A. ostoyae*) ehk tõmmu-külmaseen, mis tekitab mändidel juuremädanikku ja võib viia kiire ja massilise puude hukkumiseni. Eestis levinud külmaseene liikidest on tõmmu-külmaseen tõenäoliselt kõige ohtlikum patogeen (Hanso, Hanso 1999). Külmaseene esinemist alade kaupa kuusikutes kirjeldab tabel 4. Männikute mullaproovidest leiti külmaseen vaid ühe katseala (SA138\_10) raiesmikul, sinilille kasvukohatüübis.

**Tabel 4.** Külmasene osakaal kuuse enamusega raiesmikel ja kontrollaladel kahel järjestikusel aastal kogutud mullaproovide tulemusena

Katseala kvartal ja eraldis	Külmasene osakaal (%)				Puistu koosseis		Kkt (raiesmik/kontrollala)
	Raiesmik 2013	Raiesmik 2014	Kontrollala 2013	Kontrollala 2014	Raiesmik	Kontrollala	
SK260_7	0,4	0	0	0	70KU 30KS + RE, HB	90KU 10KS	ND
SV055_13	0	0	0	0	90KU 10MA +KS	70KU 20MA 10KS	JK
VL652_18	0	0,4	0	0	60KU 40KS	50KU, 50MA +KS	JK
EV090_1	0	0	0	0	100KU	100KU	JK
RS138_6,7	2,3	0	0	0	60KU 30MA 10KS	60KU 30MA 10KS	JK
SV109_32	0	0	0	0	80KU 10KS 10HB	90KU 10HB	JK
VL579_9	0	0	0	0	50KU 30HB 10MA 10TM +KS	40KU 30HB 20LV 10KS	JK
PE070_9	9,4	0	0	0	100 KU	100 KU	JK-ND
PE070_6	0	1,2	0	0	70KU 20HB 10KS	50KU 40HB 10KS	SL
VL652_11	0	0	0	0	90KU 10HB +KS	60KU 40MA +KS	JK
JS253_3	0	1,6	0	0	50KU 30KS 20HB +MA	40KU 30KS 20HB 10MA	JK
SV150_5	0	0	0	0	100 KU	100 KU	JK
PE177_5,6	0	2,9	0	0,3	70KU, 30MA	70MA, 30KU	ND
MO067_21	0	0	0	0	70KU 20MA 10KS	70KU 20MA 10KS	ND / JK
TT095_5	0	0	0	0	90KU 10HB	100 KU	JK
RK034_10	0	1,7	0	0	80KU, 20KS +HB, MA	50KU 40MA 10KS	SL
TR164_4	0	0,5	0	0	60KU 40MA	80MA 20KU	JK
JS254_5	0	0	0	0	70KU 20 KS 10HB	50KU 50KS	MS
KM112_24	0	0	0	0	60KU 40MA + LV, SA, RE	70KU 20MA 10KS	JK
QT095_5	0	0	0	0	70KU 20MA 10KS	70MA 20KU 10KS	JK

QT030_11	0	0	0	0	70KU 20MA 10KS +LV	60MA 40KU	JK
KM106_14	0	0	0	0	80KU 10MA 10KS +PN	50KU 30KS 20MA	SL

Külmaseen määrati 9 kuusikus, neist 8 raiesmikul ning 1 mõlemas variandis, raiesmikul ja kontrollalal. Põhiliselt kuivades männikutes leviv tõmmu-külmaseen leiti ala RK034\_10 teise aasta kuuse raiesmiku proovist.

Sarnaselt juurepessu tuvastamisele Illumina sekveneerimise meetodil, oli ka külmaseene tuvastamine mullaproovidest keeruline.

### 3.3. Juuremädanike esinemise võrdlus kahel aastal

Juuremädanike kahe aasta võrdluseks raiesmikel ja kontrollaladel koostati mudel, võttes arvesse juurepessu ja külmaseene proportsiooni kogu andmestikus esinenud OTU'de kohta (juuremädaniku tekitaja sekvenside arv jagatud kogu OTU'de arvuga uuritava alal), proovikogumise aastat ning ala tüüpi (kontrollala ja raiesmik). Tabelis 5 toodud andmed võimaldavad kirjeldada kuidas erineb patogeeni osakaal raiesmikul ja kontrollalal.

**Tabel 5.** Parameetrite hinnangud juurepessu ja külmaseene esinemise kohta kuusikutes ja männikutes raiesmikel ja kontrollaladel kahel järjestikusel aastal

	F-statistik	F-jaotuse 0,05 täiendkvantiil	Patogeeni esinemise raiesmikul (x % suurem kontrollalast)
Juurepess männikus	0,3397	3,9798	1,81
Külmaseen männikus	0,3980	3,9798	0,005
Juurepess kuusikus	0,0091	3,9532	14,71
Külmaseen kuusikus	0,1323	3,9532	4,59

Vaadeldavatel aastatel ei ole juurepessu osakaal raiumata (s.o kontrollala) ja raiutud männikutes statistiliselt usaldatavalt erinevad, sest F-statistiku väärtus (0,3397) ei ole suurem kui F-jaotuse 0,05 täiendkvantiilist (3,9798). Samuti ei ole kuusikutes kahel järjestikusel aastal juurepessu



osakaal raiumata ja raiutud katsealadel statistiliselt usaldatavalt erinevad, sest F-statistiku väärtus (0,0091) ei ole suurem kui F-jaotuse 0,05 täiendkvantiil. Juurepessu osakaal on männiraiesmikel kontrollalast 1,8% võrra suurem ja kuusikutes 14,7% võrra suurem. Külmasene arvukus ei ole raiumata ja raiutud männikutes statistiliselt usaldatavalt erinevad, sest F-statistiku väärtus (0,3980) ei ole suurem kui F-jaotuse 0,05 täiendkvantiil. Kahel aastal ei ole külmasene osakaal raiumata ja raiutud kuusikutes samuti statistiliselt usaldatavalt erinevad, sest F-statistiku väärtus (0,1323) ei ole suurem kui F-jaotuse 0,05 täiendkvantiil. Kuigi külmasene osakaal on kuuseraiesmikel kontrollalast 4,5% võrra suurem ja männiraiesmikel 0,005% võrra.

Tulemused on üldistavad, kuna mudelisse ei kaasatud konkreetseid alasid ühe tunnusega ning praeguse mudeli põhjal saab vaid öelda, et juuremädanike (s.o juurepess ja külmasene) osakaal oli raiutud aladel suurem kui kontrollaladel, siiski ei saa neid tulemusi pidada statistiliselt oluliselt erinevaks. Kuusikutes on nii külmasene kui juurepessu esinemine suurem kui männikutes, mis on oodatav tulemus, kuna kuusikud on Eestis juuremädanike poolt rohkem kahjustatud (Drenkhan 2014; Hanso 1986).

### 3.4. Visuaalne mädaniku esinemine raiesmikel käändude järgi

Mädaniku esinemise osakaalu puuliigiti ning uuritud raiesmikel kokku kirjeldab Tabel 6. Neljalt männilangi käändudelt visuaalsel hindamisel mädanikku ei tuvastatud (QT100\_3; RP039A\_7; AV065\_10; TL096\_16), aladel RP039A\_7 ja QT100\_3), kuid molekulaarse analüüsi tulemusena oli siiski juurepessu nakkus olemas (Tabel 5).

**Tabel 6.** Visuaalne mädaniku esinemise hinnangud männienamusega raielankidel

Ala	Kasvukohatüüp	Mädaniku esinemine puuliigiti (%)							Mädanikuga käändude esinemine katsealal(%)
		MA	KU	KS	HB	LV	VA	RE	
VJ109	PH	26	NA	0	NA	NA	NA	NA	26
QT099_12	PH	10	10	0	NA	NA	NA	NA	9
KJ041_1	PH	22	80	NA	NA	NA	NA	NA	43
HL378_5	PH-MS	14	0	NA	NA	NA	NA	NA	11
AJ041_8	PH-MS	7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7
TL096_16	PH	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
AV065_10	JP	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	0
SA138_10	SL	20	100	0	0	0	0	0	15
KJ096_1	PH	42	42	NA	NA	NA	NA	NA	42
QB060_8	PH	15	NA	0	NA	NA	NA	NA	15
TH162_2	JP	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6
RP039A_7	JP	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
QT103_24	PH-MS	41	NA	NA	NA	NA	NA	NA	41
RP039_9	PH	6	NA	0	NA	NA	NA	NA	6
KJ095_14	PH	5	33	NA	NA	0	NA	NA	30
KJ114_16	JP	33	55	0	0	NA	NA	NA	46
IM132_6,9	JP	45	59	0	NA	NA	NA	NA	43
IM243_13	PH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MI137_14	JP	10	65	0	NA	NA	NA	NA	29
RG205_5	JP	0	29	NA	NA	NA	NA	NA	17
QB159_2	PH	7	50	NA	NA	NA	NA	NA	9
JS262_4	MS	24	56	14	NA	NA	NA	NA	31
QB064_7	PH	10	24	0	NA	NA	NA	NA	12
KJ095_19	PH	7	20	NA	NA	NA	NA	NA	14
QT100_3	JK-SL	0	0	0	NA	NA	NA	NA	0

\*NA-puuliiki ei hinnatud

Kõige enam mädanikuga kände leiti aladelt KJ041\_1 (43% hinnatud käändudest) ja KJ096\_1 (42% hinnatud käändudest), mõlemad raiesmikud asusid pohla kasvukohatüübis, kus juurepessu

oht mändidele on suurim (Hanso, Hanso 1999). Juurepessu nakkusega männialadel oli kuuse osakaal samuti kõrge, mida kinnitab varasemalt saadud tulemust (Drenkhan *et al.* 2014).

Kuuseraiesmikel ei tuvastatud mädaniku esinemist kahel langil, jänesekapsa ja naadi kasvukohatüübis. Samas kahel alal SV055\_13 ja KJ089\_2 oli mädanikuga kändude osakaal tervelt 75 ja 73 % . Lehtpuu kändudel tuvastati mädanik kaskedel ja haabadel. Kõvalehtpuu kändudel mädanikku ei esinenud, (v.a katsealal VL579\_9).

Mädanikuga kände oli kõige enam jänesekapsa kasvukohatüübis. Sinilille kasvukohatüübi aladel oli mädaniku osakaal väike nagu ka määratud juurepessu osakaal (Tabel 2), selline tulemus võib olla tünditud vähesest katsealade arvust

**Tabel 7.** Visuaalse mädaniku esinemise hinnangud kuuseenamusega katsealadel

Ala	Kasvukohatüüp	Mädaniku esinemine puuliigiti (%)										Mädanikuga kändude esinemine katsealal (%)
		MA	KU	KS	HB	LV	VA	RE	TM	PN	SA	
PE070_6	SL	NA	21	50	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	19
PE070_9	JK-ND	NA	20	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	20
TR164_4	JK	0	33	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	33
SV055_13	JK	100	67	0	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	75
RK034_10	SL	0	37	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	7
SK260_7	ND	NA	26	0	0	NA	NA	0	NA	NA	NA	23
EV029_14	ND	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
SV109_32	JK	NA	25	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25
SV150_5	JK	NA	35	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	35
VL652_11	JK	NA	5	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5
EV090_1	JK	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
VL579_9	JK	100	38	100	33	NA	NA	NA	100	NA	NA	47
VL652_18	JK	NA	21	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	20
TT095_5	JK	NA	48	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	46
KM112_24	JK	0	18	NA	NA	0	NA	0	NA	NA	0	15
KM106_14	SL	0	30	0	NA	NA	NA	NA	NA	0	NA	18
QT124_6	JK	NA	39	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	37
QT095_5	JK	NA	13	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	13
QT030_11	JK	25	29	NA	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	28
RS138_6,7	JK	5	41	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	22
MO067_21	ND	0	40	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	31
PE177_5,6	ND	14	58	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	42
KJ089_2	JK	100	70	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	73
JS254_5	MS	NA	31	13	33	NA	NA	NA	NA	NA	NA	55
JS253_3	JK	NA	16	22	25	NA	NA	NA	NA	NA	NA	18

\*NA-puuliiki ei hinnatud

### 3.5. Teised muldades enam esinevad seenpatogeenid

Proovidest tuvastati veel üks oluline mändide juuremädaniku tekitaja s. o põleseen (*Rhizina undulata*). Nimetatud seen tuvastati neljas männi kontrollalal ja ühel männi enamusega raiesmikul ning kolmes kuuse kontrollalal, kusjuures põleseen teadaolevalt kuuske ei kahjusta, vaid on probleem kuivades männikutes (Hanso, Hanso 1999). Seene osakaal oli siiski analüüsitud kuusikute mullaproovides suhteliselt väike.

Saaresurma tekitajat *Hymenoscyphus fraxineus* ei õnnestunud ühestki proovist määrata, kuigi analüüsitud puistutes esines ka harilikku saart (*Fraxinus excelsior*). Kuid perekond *Hymenoscyphus* tuvastati mitmel katsealal, andmebaasi E-elurikkus andmetel on perekond *Hymenoscyphus* liike Eestist leitud 24.

Okaspuude pudetõve tekitajat *Lophodermium* leiti 35 kontrollalalt, ning 8 kuuse- ja männiraiesmikule. Teist pudetõve tekitajat perekonnast *Rhizosphaera* leiti 9 alalt. Perekond *Diplodia* esines üksikutel raiesmikel ja kontrollaladel väga väikestes kogustes. Nimetatud perekonna liike ei õnnestunud liigini määrata. Mullaproovidest ei määratud ühtegi karantiinset haigusetehtajat, nagu näiteks puna- ja pruunvöötaudi tekitajaid *Dothistroma septosporum* ja *Lecanosticta acicola*.

*Neonectria* perekonda tuvastati suuremal osal proovitükkidel, nii männikutes kui kuusikutes. Tuvastati *Neonectria radicolica*, mis põhjustab juuremädanikku (Chaverri jt 2011), liik esines vaid ühes kuusikus ning osakaal mullaproovist oli marginaalne. Sama perekonna liiki, kuusele koorenekroosi tekitajat *Neonectria fuckeliana*'t (Roll-Hansen, Roll-Hansen 1979) proovidest ei tuvastatud.

Sekvenerimise tulemusena tuvastati lisaks seentele ka teisi organisme, mida selles töös ei käsitletud. Kuid edasiste tööde käigus väärib põhjalikku uurimist munasseente rühm (*Oomycota*), mille perekond *Phytophthora* on oluline taimekahjustaja, ning selle esinemise kohta okaspuu puistutes on vähe teada. *Phytophthora* on tekitanud võõrliigina erinevates maailma paikades ja eelkõige metsakooslustes tõsiseid kahjustusi, ning hetkel teadaolevalt Eestile kõige lähemal Suurbritannia lehisepuistutes (Jung *et al.* 2015).

## Kokkuvõte

Magistritöö peamiseks eesmärgiks oli uurida olulisemate juuremädanike tekitajate esinemist ning dünaamikat viljakates kasvukohatüüpides vahetult peale uuendusraiet ning üks aasta peale raiet. 25-st kuuse- ning 25-st männi enmusega puistust, ning sama paljudelt kontrollaladelt koguti kahel järjestikusel aastal mullaproovid (kokku 200 proovi), millest määrati Illumina sekveneerimise meetodil mullaelustiku koosseis. Saadud tulemuste hulgast sorteeriti välja seeneriigi taksonoomilised üksused. Kõigist analüüsitud proovidest leiti kokku 1270 erinevat seeneliiki, mis on ca 17% Eestist leitud seeneliikidest.

Töö põhihüpotees, et kuusikutes on võrreldes männikutega suurem mädanikke põhjustavate seenpatogeenide arvukus, leidis kinnitust. Kändudest visuaalsel mädaniku hindamisel leiti mädaniku esinemine 23 kuuseenamusega katsealal ning 21 männikus. Kõige ulatuslikum mädaniku osakaal tuvastati jänesekapsa kasvukohatüübi kuusikust (75 %). Sinilille kasvukohatüübi puistutes oli mädaniku osakaal tagasihoidlikum, niisamuti ka molekulaarselt tuvastatud juurepessu esinemine. Senised Eestis teostatud juuremädaniku uuringud on näidanud sinilille kasvukohatüübis kõige ulatuslikumat juurepessu esinemist.

Külmaseene ja juurepessu esinemise osakaal ei muutunud statistiliselt oluliselt katseraiesmikel võrreldes kontrollaladega ühe aasta jooksul peale raiet. Kui juurepessu osakaal oli männiraiesmikel kontrollalast 1,8 % võrra suurem suus kuusikutes oli see 14,7 % võrra kõrgem. Külmaseene esinemine oli kuuse raiesmikel võrreldes kontrollaladega 4 % suurem, männi aladel erinevust polnud, kuna külmaseen tuvastati vaid ühel uuritava männiraiesmikul.

Töös püstitatud teine hüpotees, mis väitis, et juuremädanike osakaal metsamullas suureneb lageraiejärgselt, ei leidnud kinnitust.

Uurimustöö käigus tuvastati okka- ja võrsehaigusete tekitajate perekondasid – *Lophodermium* (ulatuslik esinemine katsealadel), *Rhizosphaera* ja *Diplodia*. Karantiinseid seenhaigusi uuritud katsealadelt ei identifitseeritud.

Teadaolevalt pole Eestis nii mahukat mullaelustiku analüüsi Illumina sekveneerimismeetodil teostatud, mille vahetuks eesmärgiks olid puude patogeenide tuvastamine. Saadud andmete jätkuv süstematiseerimine ja analüüs võimaldab avada olulisi seoseid erinevate seenetaksonite ja metsabiotoobi keskkonnatingimuste muutuste vahel. Seenpatogeenid avaldavad küll kõige käegakatsutavamad (negatiivset) mõju majandusmetsadele, kuid oluline on uurida lisaks ka mükoriisaseente kooslusi, kuna sümbiontidena on nad puude elutsüklis väga olulised.

Lisaks on saadud tulemustel nii looduskaitseline kui ka metsamajanduslik väärtus. Täiendava andmeteanalüüsi tulemusi on tulevikus võimalik kasutada kliimamuutuste mõju uurimiseks Eesti seenestikule. Ka on leitud andmestik huvipakkuv mükoloogidele, metsapatoloogidele ning metsamajandajatele.

## **Tänuavaldused**

Uurimistöö teostamisel ja magistritöö kirjutamisel olid olulised juhendajate Rein ja Tiia Drekhani ning Ivar Sibula nõuanded ja soovitused. Autor avaldab erilist tänu Leho Tedersoole. Labortööde teostamisel ja bioinformaatilise töötluse osas andsid hindamatut abi Kalev Adamson, Rasmus Puusepp, Taavi Riit ja Sten Anslan. Autor tänab nõuannete eest Eneli Allikmäed ja Britt Puidetit.

Käesolev magistritöö valmis Riigimetsa Majandamise Keskuse metsakaitse uurimisprojekti nr. 8-2/T12115MIMK (2012–2015) toel.

## Summary

The main purpose of this master's thesis was to investigate the occurrence and dynamics of root rot in fertile forest site types directly after clear-cut and one year after. Soil samples were collected from 25 Norway spruce (*Picea abies*) and 25 Scots pine (*Pinus sylvestris*) clear-cut areas and same amount from the reference areas in two consecutive years (in all 200 samples). The collected samplings were analysed with Illumina sequencing to determine the structure of the fungal communities. 1270 species were detected from all analysed samples, which is ca 17,2 % of fungal species found in Estonia.

One of the hypothesis described spruce stands to have more extensive occurrence of root rot compared with pine stands. Visual estimation of stumps found that 23 of 25 spruce stands were decayed and 21 of 25 pine stands were decayed. The most extensive proportion of decay established in two *Oxalis* site type spruce stands (75%). Number of decayed stumps on *Hepatica* site type was quite low as the results of molecular analysis also showed low proportion of *Heterobasidion*. Generally known, *Hepatica* site type is one of the most sensitive areas for *Heterobasidion* infection.

There were no statistically significant differences by *Armillaria* and *Heterobasidion* proportions between clear-cut and control areas in two years comparison didn't have relevant differ. However, proportion of *Heterobasidion* in pine stands were 1,81 % higher and spruce stands were 14,71 % higher compared to control areas. The occurrence of *Armillaria* in spruce stands were 4 % higher than in control areas one year after felling. In case of pine stands, the difference was close to zero, *Armillaria* was detected only in one pine stand.

Other pathogenic fungi were detected, like needle diseases – *Lophodermium* (extensive spread), *Rhizosphaera* and *Diplodia*. The new and invasive species (e. g. needle blights) were not found from soil samples.

Such large-scaled soil biota analyses were never done (in available data) by Illumina sequencing in focus on pathogenic fungi in Estonia. Further analysis of this data provides to



find some relevant and interesting relations and new results. Pathogenic fungi (especially root rot) affects the economical side of forest management. The results of this thesis have values on forest protection and silviculture. Additional analysis and results may enable to make models in future about climate change affection on Estonian fungal communities. The results should interest the mycologists, forest pathologists and forest owners.

## Kasutatud kirjandus

1. **Aastaraamat mets 2013.** (2014). Tartu: Keskkonnaagentuur. 243 lk.
2. **Asiegbu, F. O., Adomas, A., Stenlid, J.** (2005). Conifer butt and root rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s.l. – *Molecular plant pathology*, Nr 6 (4), lk 395–409.
3. **Bendz-Hellgren, M., Stenlid, J.** (1998). Effects of clear-cutting, thinning, and wood moisture content on the susceptibility of Norway spruce stumps to *Heterobasidion annosum* – *Canadian Journal of Forest Research*, Nr 28 (5), lk 759–765.
4. **Blackwell, M.** (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? – *American Journal of Botany*, Nr 98 (3), lk 426–438.
5. **Butin, H.** (1995). Tree diseases and disorders. Causes, Biology and Control in Forest and Amenity Trees. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press. 252 lk.
6. **Byrd, K. B., Parker, V. T., Vogler, D. R., Cullings, K. W.** (2000). The influence of clear-cutting on ectomycorrhizal fungus diversity in a lodgepole pine (*Pinus contorta*) stand, Yellowstone National Park, Wyoming, and Gallatin National Forest, Montana – *Canadian Journal of Botany*, Nr 78 (2), lk 149–156.
7. **Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A. Y., Samuels, G. J.** (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs – *Studies in Mycology*, Nr 68, lk 57–78.
8. **Drenkhan, R., Adamson, K.** (2013). Perekond männi (*Pinus*) okkahaiguste tekitajate lühimääraja. Tartu: Eesti Maaülikool, 26 lk.
9. **Drenkhan, T., Rähn, E., Jürimaa, K., Adamson, K., Padari, A., Drenkhan, R., Pilt, E.** (2014). Juuremädanike levik on arvatust ulatuslikum – *Eesti Mets*, Nr 4, lk 45–49.
10. **Edgar, R. C.** (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST – *Bioinformatics*, Nr 26 (19), lk 2460–2461.
11. **Fox, J.** (2011). An R companion to applied regression. Thousand Oaks: SAGE. 449 lk.
12. **Garbelotto, M., Linzer, R., Nicolotti, G., Gonthier, P.** (2009). Comparing the influences of ecological and evolutionary factors on the successful invasion of a fungal forest pathogen. – *Biological Invasions*, Nr 12, lk 943–957.

13. **Hanso, M., Drenkhan, R.** (2008) Puna-, pruun- ja valgevöötaud Eestis. – *Eesti Mets*, Nr 3, lk 16–22.
14. **Hanso, S., Hanso, M.** (1999a). Juurepessu levimisest Eesti metsades. – *Metsanduslikud uurimused*, Nr 31, lk 162–172.
15. **Hanso, S., Hanso, M.** (1999b). Juurepessu levimisest Eesti metsades. – *Metsanduslikud uurimused*. Nr 31, lk 162–172.
16. **Hanso, S.** (1986). Juurepessu tekitaja *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Ökoloogiast. Metsakaitse. Tallinn: Valgus, lk 137–152.
17. **Ihrmark, K., Bödeker, I. T., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., Lindahl, B. D.**, (2012) New primers to amplify the fungal ITS2 region--evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities – *Federation of European Microbiological Societies*, Nr 82-(3), lk 666-667.
18. **Jung, T., Orlikowski, O., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A., G., Aguin Casal, O., Bakonyi, J., Cacciola, S. O., Cech, T., Chavarriaga, D., Corcobado, T., Cravador, A., Decourcelle, T., Denton, G., Diamandis, S., Dogmus-Lehtijarvi, H. T., Franceschini, A., Ginetti, B., Glavendekic, M., Hantula, J., Hartmann, G., Herrero, M., Ivic, D., Horta Jung, M., Lilja, A., Keca N., Kramarets, V., Lyubenova, A., Machado, H., Magnano di San Lio, G., Mansilla Vazquez, P., J., Marcais, B., Matsiakh, I., Milenkovic, I., Moricca, S., Nagy Z. A. , Nechwatal, J., Olsson, C., Oszako, T., Pane A., Paplomatas, E. J., Pintos Varel, C., Prospero, S., Rial Martinez, C., Rigling, D., Robin, C., Rytkonen A., Sanchez M. E., Scanu B., Schlenzig, A., Schumacher, J., Slavov, S., Solla, A., Sousa, E., Stenlid, J., Talgø, V., Tomic, Z., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A., M., Wenneker, M., Woodward, S., Perez-Sierra, A.** (2015). Widespread Phytophthora infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of Phytophthora diseases. – *Forest pathology*, Nr 1, lk 1–30.
19. **Lushaj, M., Woodward, S., Keča, N., Intini, M.** (2009). Distribution, ecology and host range of Armillaria species in Albania.
20. **Mattila, U., Nuutinen, T.** (2007). Assessing the incidence of butt rot in Norway spruce in southern Finland – *Silva Fennica*, Nr 41(1), lk 29–43.
21. **OEPP/EPPO.** (2015). Diagnostics: PM 7/46 (3) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma*.

22. **Pehl, L., Cech, T. L., Ioos, R.** (2015). PM 7/46 (3) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma pini*. EPPO Bullentin, Nr 45, lk 163–182.
23. **Piri, T., Korhonen, K., Sairanen, A.** (1990). Occurrence of *Heterobasidion annosum* in pure and mixed spruce stands in Southern Finland. – *Scandinavian Journal of Forest Research*, Nr 5, lk 113–125.
24. **Redfern, D., Stenlid, J.** (1998). Spore Dispersal and Infection. In *Heterobasidion annosum*. Biology, Ecology, Impact and Control. (Edited by S. Woodward, J. Stenlid, R. Karjalainen & A. Hüttermann). Wallingford: UK, lk 105– 124.
25. **Roll-Hansen, F., Roll-Hansen, H.** (1979). Microflora of sound-lookind wood in *Picea abies* stems. – *European Journal of Forest Pathology*, Nr 9, lk 308–316.
26. **Roll-Hansen, F., Roll-Hansen, H.** (1981). Root wound infection of *Picea abies* at three localities in southern Norway. Meddelelser fra Norsk institutt for skogforskning. Nr 36.
27. **Rähn, E.** (2014). Juuremädanike esinemine hariliku kuuse puistutes harvendusraiete järgselt. (Bakalaureusetöö). Eesti Maaülikooli metsandus- ja maaehitusinstituut. Tartu.
28. **Rönnerberg, J., Jørgensen, B. B.** (2000). Incidence of Root and Butt Rot in Consecutive Rotations of *Picea abies*. – *Scandinavian Journal of Forest Research*, Nr 15, lk 210-217.
29. **Saar, I.** (2015). Seente asend elupuul ja seente süstemaatika 1. – *Eesti Loodus*, Nr 147, lk 20–24.
30. **Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., Weber, C. F.** (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities – *Applied and Environmental Microbiology*, Nr 75 (23), lk 7537–7541.
31. **Smith, I. M., Dunes, J. Phillips, D. H., Lelliott, L. A., Archer, S. A.** (1988). European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications. 517 lk.
32. **Tedersoo, L.** (2007). Ectomycorrhizal fungi: diversity and community structure in Estonia, Seychelles and Australia. (Dokoritöö). Tartu Ülikooli botaanika ja ökoloogia instituut. Tartu.
33. **Tedersoo, L., Bahram M., Põlme S., Kõljalg U., Yorou N. S., Wijesundera R., Villarreal Ruiz L., Vasco-Palacios A. M., Thu P. Q., Suija A., Smith M. E., Sharp C., Saluveer E., Saitta A., Rosas M., Riit T., Ratkowsky D., Pritsch K., Põldmaa K., Piipenbring M., Phosri C., Peterson M., Parts K., Pärtel K., Otsing E., Nouhra**

- E., Njouonkou A. L., Nilsson R. H., Morgado L. N., Mayor J., May T. W., Majuakim L., Lodge D. J., Lee S. S., Larsson K. H., Kohout P., Hosaka K., Hiiesalu I., Henkel T. W., Harend H., Guo L. D., Greslebin A., Grelet G., Geml J., Gates G., Dunstan W., Dunk C., Drenkhan R., Dearnaley J., De Kesel A., Dang T., Chen X., Buegger F., Brearley F. Q., Bonito G., Anslan S., Abell S., Abarenkov, K. (2014).** Global diversity and geography of soil fungi. – *Science* 346, Issue 6213, lk 1256688-1–1256688-10.
34. **Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., Kisand, V., Nilsson, H., Hildebrand, F., Bork, P., Abarenov, K. (2015).** Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. – *MycKeys*, Nr 10, lk 1–43.
35. **Thor, M., Stenlid, J. 2005.** Heterobasidion annosum infection of Picea abies following manual or mechanized stump treatment. – *Scandinavian Journal of Forest Research*, Nr 20 (2), lk 154–164.
36. **Woods, C. M., Woodward, S., Redfern, D. B. (2000).** Receptivity of Picea sitchensis stumps to infection by *Heterobasidion annosum* basidiospores. – *Forestry*, Nr 73 (5), lk 457–465.
37. **eElurikkus. (2015).** eElurikkuse andmebaas.  
[\[http://elurikkus.ut.ee/search\\_er2.php?qresult=yes&lang=est&tax1=contains&tax2=hymenocyphus&common1=contains&common2\]](http://elurikkus.ut.ee/search_er2.php?qresult=yes&lang=est&tax1=contains&tax2=hymenocyphus&common1=contains&common2) (15.05.2016)

## Lihtlitsents

Mina, Elisabeth Rähn  
(8.01.1992 )

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö  
“Okaspuuenamusega majandusmetsade seenpatogeenide levik ja dünaamika lõppraiate järgses  
metsamullas”  
mille juhendajad on Rein Drenkhan, Tiia Drenkhan ja Ivar Sibul
  - 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
  - 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
  - 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemisekskuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor \_\_\_\_\_  
allkiri

Tartu, 19.05.2016

Juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

_____	_____
(juhendaja nimi ja allkiri)	(kuupäev)
_____	_____
(juhendaja nimi ja allkiri)	(kuupäev)
_____	_____
(juhendaja nimi ja allkiri)	(kuupäev)