

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Botaanika osakond

Epp Maria Lillipuu

Arbuskulaar-mükoriisseid seeni  
sisaldavad inokulaadid  
põllumajanduses

Magistritöö

Bioloogia

30 EAP

Juhendajad: Inga Hiiesalu, PhD, Tanel Vahter, MSc

Tartu 2020

## **Arbuskulaar-mükoriisseid seeni sisaldavad inokulaadid põllumajanduses**

Arbuskulaar-mükoriissed (AM) seened aitavad taimedel mullast toitaineid omastada, pakuvad kaitset stressi vastu ning parandavad mulla struktuuri. Tavapõllumajanduse praktikad mõjuvad AM seenekooslustele negatiivselt. AM seeni sisaldavaid inokulaate kasutades soovitakse inokulatsiooniga taimede kasvu ja saagist parandada, kuid inokulaate uurinud tööd on leidnud nende efektiivsuse kohta vastakaid tulemusi. Oma magistritöös uurin potikatses 11 tööstusliku inokulaadi võimet taimejuuri koloniseerida, neis sisalduvate AM seente ja muude mikroorganismide mõju taime biomassile ning tootekirjelduses olevate AM seeneliikide vastavust tegelikule koostisele. Leidsin, et vaid kaks inokulaati tekitasid taimedel juurte kolonisatsiooni ning inokulaatides olevate AM seened ja muud mikroorganismid ei omanud olulist positiivset mõju taimede biomassidele. Inokulaate sekveneerides tuli välja, et tootekirjelduses olevad AM seene liigid ei vasta suures osas neist leitud liikidele ning mitmes tootes oli AM seeni väga vähe või puudusid nad sootuks. Seega tuleks AM seeni sisaldavate inokulaatide tulemuslikuks rakendamiseks pöörata senisest suuremat tähelepanu inokulaatide kvaliteedikontrollile.

Märksõnad: arbuskulaarne mükoriisa, arbuskulaar-mükoriissed seened, inokulaadid, biostimulaatorid, põllumajandus, krohmseened, sekveneerimine

CERCS: B270 Taimeökoloogia

## **The use of inoculi containig arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture**

Arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) fascilitate plant nutrient acquisition, improve their resistance against stress and improve soil structure. Many practices used in conventional agriculture have a negative effect on AMF communities. Inoculi containing AMF are often used to improve plant growth and yield, but studies on the effectiveness of inoculi have shown contradictory results. In my master's thesis I study on the basis of 11 different AMF products in a pot experiment, whether they can colonize plant roots, the effect of AMF and other microorganisms on plant biomass and whether the AMF species in the product description match the actual contents. I found that AMF in only two inoculi colonized the roots and AMF or other microorganisms did not have a significant effect on plant biomasses. By sequencing the inoculates, I found that the AMF species in the product description did not match the actual species in the most part and in several products abundance of AMF was very low or they were missing altogether. Therefore, in order to use industrial AMF inoculi effectively, greater attention should be put on quality control of these products.

Key words: arbuscular mycorrhiza, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), inoculi, , biostimulants, agriculture, sequencing

CERCS: Plant ecology B270

# Sisukord

Sisukord.....	4
Sissejuhatus .....	5
1. Arbuskulaarne mükoriisa .....	7
1.1 AM seente levik looduses .....	8
1.2 AM seente morfoloogia ja elutsükel .....	9
1.3 Arbuskulaarse mükoriisa mõju taimedele agroökosüsteemides .....	12
1.3.1 Toitainelised mõjud.....	12
1.3.2 Mitte-toitainelised mõjud .....	13
2. AM seente kasutamine põllumajanduses .....	15
2.1 AM seeni mõjutavad põlluharimispraktikad.....	15
2.2 Tööstuslikud inokulaadid.....	17
3. Materjal ja meetodika .....	21
3.1 Inokulaadid .....	21
3.2 Potikatse inokulaatidega .....	21
3.4 Juurte värvimine ning mikroskopeerimine .....	24
3.5 Andmeanalüüs.....	25
3.6 Inokulaatide sekveneerimine .....	25
4. Tulemused.....	27
5. Arutelu .....	35
Kokkuvõte .....	40
Kasutatud kirjandus.....	43
Lisa 1: Tooted.....	56
Lisa 2. ....	59

## Sissejuhatus

Mutualistlik sümbioos on mõlemale osapoolle kasulik kooseluvorm erinevate liikide vahel. Sümbioosi esinemine taime ja mükoriisaseente vahel on järjest enam tähelepanu pälvinud uurimisvaldkond, kuna pakub potentsiaalset kasu taimekasvu edendamisel nii põllumajanduses kui ka näiteks looduslike taimekoosluste taastamisel, metsade majandamisel ja muudes valdkondades. Mükoriisa on taimedel laialt levinud, esinedes lausa 92% kõigist taimesugukondadest, millest evolutsiooniliselt varaseim ja ka praegusel ajastul kõige levinum on arbuskulaarne mükoriisa (AM), mis esineb 80% kõikidest taimesugukondadest (Wang ja Qiu, 2006; Smith ja Read, 2008). Selles mutualistlikus suhtes varustab taim seenpartnerit fotosünteesi produktidega ning seen omakorda aitab taimel hüüfide abil mullast toitaineid omastada. Lisaks pakub arbuskulaar-mükoriisse seensümbiondi olemasolu taimedele kaitset biotilise ja abiotilise stressi vastu ning parandab mulla struktuuri, läbi mille väheneb erosioonioht ning suureneb mulla veehoiuvõime ning õhustatus (Wright ja Upadhyaya, 1997). Kuna paljud põllumajanduses kasvatatavad taimeliigid on võimelised looma sümbioosi AM moodustavate seentega, aitaks taimede ja seente vaheliste suhete põhjalikum mõistmine ja nende teadmiste rakendamine arendada jätkusuutlikku põllumajandust.

Intensiivpõllumajanduses kasutusel olevad maaharimise praktikad põhinevad mineraalväetiste ja taimekaitsevahendite kasutamisel, kündmisel ning monokultuuride kasvatamisel. Aina intensiivistuv maakasutus seab ohtu üldise elurikkuse, kaasa arvatud AM seente liigirikkuse ning mulla ja õhu kvaliteedi (Stoate jt., 2001). Maaharimispraktikad, nagu orgaaniliste ja haljasväetiste kasutamine ning vahekultuuride kasvatamine, soodustavad mullaelustiku sh. AM seente elurikkust ning suurendavad taimejuure kolonisatsiooni ehk nakatumist AM seenega (Gryndler jt., 2001; Oehl jt., 2004; Jansa jt., 2006). Lisaks on hakatud tootma tööstuslikke AM seeni sisaldavaid biostimulaatoreid ehk inokulaate, mille kasutamine mahe- ja tavapõllumajanduses on tõusev trend (Igiehon ja Babalola, 2017). Inokulatsiooni ehk antud töö kontekstis AM seente leviseid sisaldava toote ehk inokulaadi mullale või kasvusubstraadile lisamisega on võimalik tõsta AM seente rohkust.

Inokulatsioonist maksimaalse kasu saamiseks tuleb eelnevalt teada millised on mullatingimused antud põllul või kasvuhuones, kas inokulaadi näol on tegu kohalike seeneliikide või -genotüüpidega ning millist taime soovitakse inokuleerida. Ebasobiva inokulaadi kasutamine võib põhjustada hoopis taimekasvu vähenemist või mitte-sihtmärki taime

kasvu paranemist (Corkidi jt., 2004; Schwartz jt., 2006). Introdutseeritud AM seene genotüüp võib muutuda invasiivseks ning põhjustada kohaliku seenekoosluse muutumist ning ohustada kohalikku genotüüpi (Hart jt. 2018). Tööstuslikult toodetud inokulaate kasutatakse siiski veel vähe, sest põllupidajate teadmised mullaelustikust sh. AM seentest on pigem vähesed. Praegu on turul saadaolevad inokulaadid mõeldud pigem hobiaednikele ja väikepõllupidajatele, seda mõistavad ka tootjad, kes turustavad oma tooteid kuni mõnekilostes pakendites. Inokulaatide pakkujate ja tarbijate hulk kasvab aga kiiresti ning seega on oluline uurida nende toodete mõju taimekasvule (Chen jt., 2018). Varasemates töödes on leitud, et inokulaatidel võib olla nii positiivne kui ka negatiivne mõju taimede biomassile ja kolonisatsioonile (Lekberg ja Koide, 2005; Hijri, 2016). Leitud on ka kolonisatsiooni ja taime kasvuvastuse täielikku puudumist ning toodetes on täheldatud elujõuliste leviste madalaid hulki (Tawaraya, 2003; Corkidi jt., 2004 ; Faye jt., 2013). Samuti on toodetes sisalduvate eoste mikroskoopilisel määramisel leitud, et need ei vasta sageli tootekirjeldusele (Faye jt., 2013).

Põhinedes varasemalt tehtud töödele, mis võrdlesid tööstuslikke inokulaate (Faye jt., 2013; Corkidi jt., 2004; Rowe jt., 2007), püstitan oma töös kolm hüpoteesi:

- 1) ligikaudu pooltes testitud inokulaatides koloniseerivad neis sisalduvad AM seened taimede juuri;
- 2) inokulaatide AM seentest tulenev mõju tõstab mõõdukal määral taimede biomassi;
- 3) tootekirjelduses olevad AM seeneliigid vastavad sekveneerimistulemustele osaliselt.

Käesolevas magistritöös annan kirjanduse põhjal ülevaate AM seente olemusest ning nende kasutamisest põllumajanduses. Võrdlen potikatses 11 tööstusliku arbuskulaar-mükoriisseid seeni sisaldava inokulaadi mõju hariliku kaera ja hariliku maisi biomassile. Uurin, kas tooted sisaldavad lubatud AM seeneliike ning kas ja mil määral koloniseerivad need taimejuuri. Inokulaatide sekveneerimisega kontrollin ka toodetes olevate seente virtuaalsete taksonite vastavust toodetel kirjas olevatele liikidele.

## 1. Arbuskulaarne mükoriisa

Esmakordselt kirjeldati arbuskulaarset mükoriisat 1842. aastal ning kuigi AM struktuure tuvastati laialdasest erinevatelt troopilistelt peremeestaimedelt, jäid enamuse selle sümbioosi toimimismehhanisme kuni 1950. keskpaigani mõistatuseks (Nägeli, 1842; Koide ja Mosse, 2004; Smith ja Read, 2008). Arbuskulaar-mükoriisest sümbioosi moodustavad seened, mis kuulvad alamhõimkonda *Glomeromycotina* ehk krohmseened (Spatofora jt., 2016).

AM seente roll mulla toitaineringluses on tähtis mitmel põhjusel:

- 1) Nad varustavad taimi mullatoitainetega nagu fosfor ja lämmastik ning ka mikrotoitainetega (Parniske, 2008).
- 2) AM seened võivad moodustada kuni 50% mulla mikroobsest biomassist ning on seega olulised toitainete talletajad ja mulla mikroobikoosluse kujundajad (Olsson jt., 1999; Mechri jt., 2014).
- 3) AM seente olemasolu suurendab mulla veehoiuvõimet ning parandab mulla struktuuri, mis vähendab toitainete leostumist ning seeläbi mõjutab ka muid mullas elavaid organisme. (Augé, 2004, Rillig ja Mummey, 2006)

Oma olemuselt on AM seened obligatoorsed sümbiondid ning nad on võimetud ilma taimperemehega elutsüklit läbima. Taim võib seensümbiondile edasi anda kuni 22% seotud süsinikust (Wright jt., 1998), saades seenelt vastu nii toitainelisi kui mitte-toitainelisi hüvesid. Tänu laiale juurevälisele hüüfivõrgustikule, kus väiksemad hüüfid võivad olla 2 µm läbimõõduga võrreldes taimede peenjuurtega, mida mõõdetakse mm skaalal, on mükoriisa kaudu võimalik suurendada juurte toitainete imendumise ala. AM kaudu võib taim omastada efektiivsemalt fosforit ja lämmastikku, aga ka mikroelemente nagu tsinki, vaske, kaaliumit, kaltsiumi ja rauda (Smith ja Read, 1997; Liu jt., 2000; George jt., 1992; Clark ja Zeto, 2000). Lisaks toitainelistele hüvedele pakub seensümbiont taimele ka kaitset abiootilise stressi nagu põua, liigse mulla soolsuse ja raskemetallide ning biootilise stressi nagu patogeenide ja herbivooride vastu (Galli jt., 1994; Azcón-Aguilar ja Barea, 1996; Bothe, 2012). Samuti parandab AM seente lagunemisel tekkiv glükoproteiin glomaliin mulla kvaliteeti, selle agregeeritust ja poorsust (Rillig ja Mummey, 2006; Wright ja Upadhyaya, 1997).

Suhtes, kus taim ja seen saavad mõlemad vastastikkust kasu, kirjeldatakse tihti taime kui „peremeest“, mis justkui viitaks parasitisele suhtele, kuid arvestades, et sõltuvalt keskkonnatingimustest võib see suhe varieeruda mutualismist parasitismini, on selle kirjelduse kasutus antud kontekstis sobiv. AM seene ja taime vaheline assotsiatsioon võib väljenduda

positiivses kuni negatiivses taime kasvuvastuses, sest faktoreid, mis mõjutavad sümbioosi olemust on mitmeid, näiteks oleneb see taime ja seene liigist, valgustingimustest, vee kättesaadavusest ja edaafilistest tingimustest nagu mullatoitainete kättesaadavus (Johnson jt., 1997; Johnson ja Graham, 2012; Smith ja Smith, 2013).

## 1.1 AM seente levik looduses

Arbuskulaar-mükoriisne sümbioos on ürgne ning suure tõenäosusega oli 480 miljonit aastat tagasi eksisteerivatel krohmseentel oluline roll maismaataimede levikul ja arengul, kuna nad aitasid varajastel taimedel vähearenenud mullast toitained kätte saada (Wang ja Qiu, 2006; Read jt., 2000; Brundrett, 2002). Tänapäevalgi on just arbuskulaarne mükoriisa kõige levinum mükoriisa tüüp, esinedes 80% soontaimede sugukondadel. Arbuskulaarne mükoriisa on levinud pea kõikjal maailmas. Eriti suur AM seente mitmekesisus on troopilistes vihmametsades ja parasvöötme rohumaadel, mille üheks põhjuseks on kõrge peremeestaimede mitmekesisus (Schübler jt., 2001; Smith ja Read, 2008). AM seened on levinud ka kuivadel ning toitainevaestel muldadel, aidates taimedel omastada piisavalt mineraalaineid ja vett (Smith ja Read, 2008). Sümbioosi AM seenega on leitud ligi 200 000 taimeliigil, samas kui AM seente morfoloogiliselt määratletud liike on teada 334 (Schübler, 2020). Molekulaarsetel tunnustel põhinevad uuringud pakuvad AM seente taksonite arvuks 450-1000 (Öpik jt., 2010; Kivlin jt., 2011). Kuna AM seentel on madal peremehespetsiifilisus, võib peremeestaim looduslikus ökosüsteemis olla koloniseeritud mitmete krohmseeneliikidega (Marschner ja Timonen, 2005; Davison jt., 2016; Davison jt., 2020).

AM sümbioosi on uuritud kõige enam rohttaimedel, kuid ka suur osa puittaimedest, näiteks perekondade pappel (*Populus*), vaher (*Acer*), õunapuu (*Malus*) ja paju (*Salix*) liigid on arbuskulaar-mükoriissed, mistõttu võiks lisaks ektomükoriisale arvestada AM seente ökoloogiat ka metsamajandamisel ja erinevate taimekoosluste taastamisel (Smith ja Read, 2008). Taimesugukondadest, kes ei moodusta mükoriisat või teevad seda väga vähesel määral, võiks välja tuua majanduslikult olulised sugukonnad nagu tatralised (*Polygonaceae*), ristõielised (*Brassicaceae*) ja maltsalised (*Chenopodiaceae*) (Smith ja Read, 2008).

Oma suurte mullasiseste spooride tõttu on AM seente levikut peetud teiste seentega võrreldes aeglaseks. Lisaks mitte-suguliselt spooridega paljunemisele võivad levisteks olla ka koloniseeritud juureosakesed ning mullasisesed müteseele osad (Smith ja Read, 2008). Levimisvektoriks võivad olla mulla selgrootud (Harinikumar ja Bagyaraj, 1994), linnud

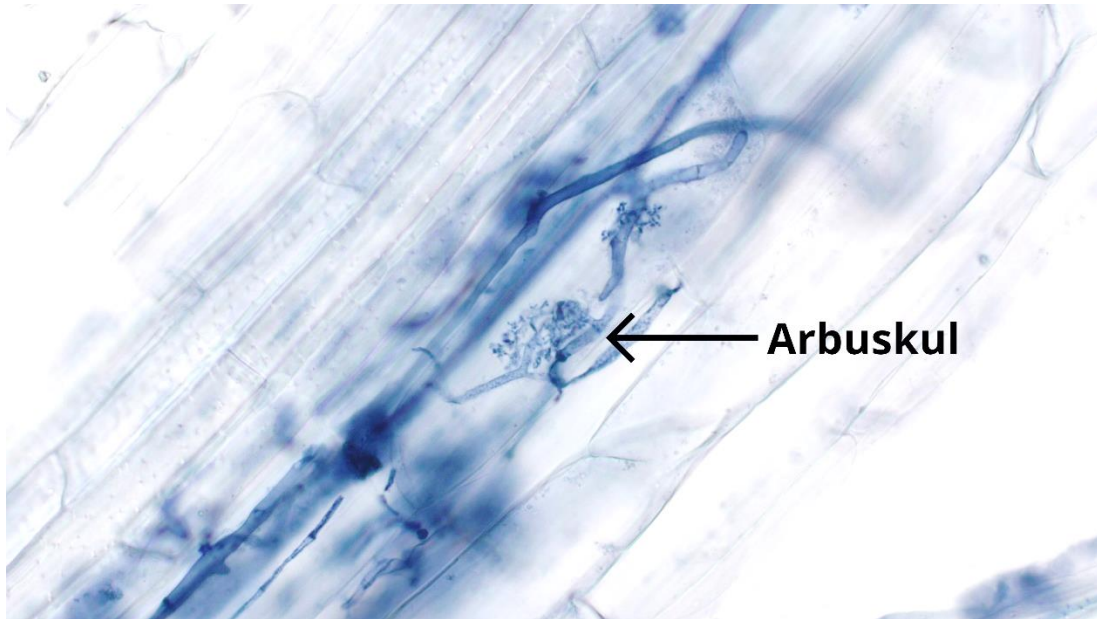


(Nielsen jt., 2016), närilised (Mangan ja Adler, 2002) ja kabjalised (Lekberg jt., 2011), aga ka abiootilised tegurid nagu tuul ja vesi (Harner jt., 2011; Egan jt., 2014; Chaudhary jt., 2020). Ka inimesed on maaharimise ja rändamisega AM seente levimisele kaasa aidanud (Rosendahl jt., 2009). Kuna koguni 93% kõikidest AM seente taksonitest on levinud mitmel kontinendil, on see märgiks, et nende kauglevimine lindude, inimtegevuse tuule ja veega on efektiivne (Davison jt., 2015). AM seente spooride levikut uurinud katses leiti, et 20 m kõrgusel olevate spooride suurus jäävad alla 70 µm ning kui spoori suurus on tuulega levimist kinnitav tunnus, on pooled AM seente perekonnad potentsiaalsed tuullevijad (Chaudhary jt., 2020).

## 1.2 AM seente morfoloogia ja elutsükkel

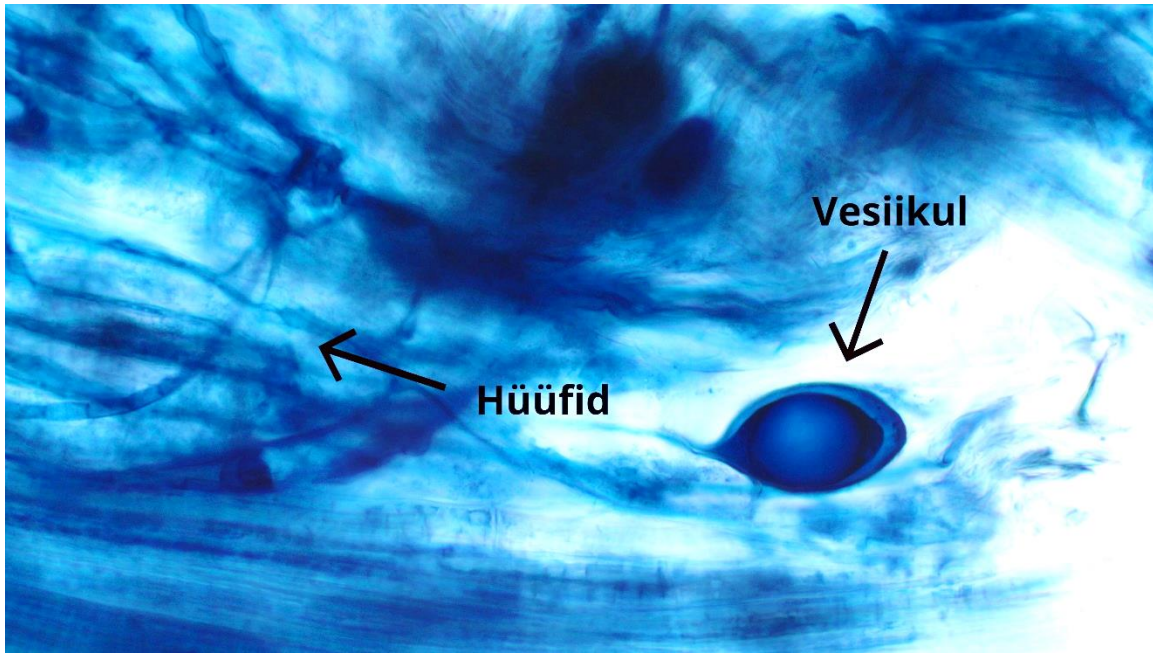
Arbuskulaarse mükoriisa moodustavad kolm peamist komponenti: taimejuur, juurerakkude sisesed ja/või vahelised hüüfid ning juureväline mütseel (Smith ja Read, 2008). AM seened moodustavad juure sees arbuskuleid, vesiikuleid ja hüüfe ning väljaspool juurt juurevälist mütseelivõrgustikku ja spooresid (Smith ja Read, 2008; Smith ja Smith, 2011).

AM seente eripäraks on taimejuures arbuskulite ehk põõsakujuliste dihhotoomselt jagunenud hüüfijätmete kogumikud (Joonis 1), mis asuvad juurerakkude sees, kuid väljaspool tsütoplasmat ning on arvatavasti oma suure välispindala tõttu põhiliseks toitainete ja vee vahetamise kohaks seene ja taime vahel (Smith ja Read, 2008). Selleks, et arbuskuleid "majutada" peavad taimed rakutasandil enda ehitust muutma - arbuskulit sisaldav rakk liigutab oma tuuma raku keskosasse, väheneb vakuooli ruumala, plastiidide morfoloogia muutub, et vältida tärklise kuhjumist ning tsütoskelett paigutatakse arbuskulite ümber (Reinhardt, 2007; Gianinazzi-Pearson, 1996). Arbuskulite eluiga on võrreldes teiste AM seene struktuuridega väga lühike - kõigest 1-3 päeva, peale seda need lagunevad ning kaovad rakust (Kobae jt., 2010). Seetõttu on ka kolonisatsiooni mikroskoobiga määrates arbuskuli nägemine pigem harv juhus.



**Joonis 1.** Arbuskulid ja hüüfid trüpaansinisega värvitud hariliku maisi juures (Autori foto).

Vesiikulid on AM seente säilitusorganid, mis koosnevad paisunud hüüfidest ning arenevad peale arbuskulite teket, kuid püsivad ka peale nende kadumist (Joonis 2). Lipiide ja tsütoplasmat sisaldavad vesiikulid võivad esineda nii raku sees kui ka rakuvaheruumis ning tihti toimivad need ka levistena. Kuigi ka vesiikulid saavad toimida levistena, aetakse neid keraja välimuse tõttu mõnikord segamini mullas arenenud eostega (Smith ja Read, 2008; Biermann ja Linderman, 1983). Vesiikuleid ei moodusta aga kõik krohmseened, mistõttu varasemalt kasutusel olev termin "arbuskulaar-vesikulaarne mükoriisa" on asendunud abuskulaarse mükoriisaga. *Gigasporaceae* sugukonna seened moodustavad vesiikulite asemel abistavaid rakke (ingl k. *auxiliary cells*) juurevälisel mütseelil (Smith ja Read, 2008).



**Joonis 2.** Vesiikul ja hüüfid trüpaansinisega värvitud hariliku maisi juures (Autori foto).

Hüüfid on filamentsed torujad seenestruktuurid, mis juure sees moodustavad arbuskuleid, vesiikuleid, keerdunud hüüfe (ingl k. *coils*). Hüüfid ja selle osad võivad olla ka levisteks ning hüüfijätkete paksenemisel juure parenhüümirakkudes või mullas moodustuvad seeneeosed (Bever jt., 2001). Juureväline mütseel võib kasvada mullas mitmekümne cm pikkuseks ning suurendab seega taime jaoks pindala, kust toitaineid kätte saada (Smith ja Read, 2008). Kohtades kus taime juur on AM seenega nakatunud hakkab arenema mütseelikogum, mis kasvades võib nakatada sama taime juurt mõnest teisest kohast või levida isegi kõrvaloleva taimeni (Smith ja Smith, 2011). Hüüfide diameeter võib varieeruda 2-20  $\mu\text{m}$ . Sõltuvalt AM seene liigist võivad juurevälise mütseeli hüüfide diameetrid ning vahemaa, kui kaugelt toitaineid omastatakse erineda (Smith ja Smith, 2011; Jansa jt., 2003). Hüüfikogumike läbipõimumine mullas aitab kaasa mullaagregaatide moodustumisele. Hüüfide pinnale eritatud polümeerid, mis seovad mineraalseid osakesi, stabiliseerivad mullaagregate (Jastrow ja Miller, 1997).

Taimesiseste hüüfide moodustamise põhjal eristatakse peamiselt kahte tüüpi arbuskulaarset mükoriisat:

1. *Paris*-tüüp (*Paris-type*) - hüüfid saavad kasvada vaid taimeraku sees, liikudes rakust rakku, kuid ei läbi rakumembraani ning moodustavad keerdunud hüüfe taime parenhüümirakkudes. Seda tüüpi AM'i on leitud rohkematelt taimesugukondadelt.
2. *Arum*-tüüp (*Arum type*) - hüüfid kasvavad taimerakkude vahel, läbides taimeraku kesta, kuid mitte rakumembraani, hüüfide külgharud moodustavad põdsakujulisi arbuskuleid

juurte koorerakkudes. Seda tüüpi seened on kiired koloniseerijad, kes loovad sümbioosi kiirekasvuliste taimedega (Smith ja Read, 2008).

Peale eose idanemist moodustuvad algelised eelhüüfid ning kui need teatud aja jooksul sobivat taime ei leita peatub nende kasv, rakus tõmmatakse tagasi tsütoplasma ja tuum, moodustakse vaheseinad ning pikaajase elujõulisusega spoor jääb mulda sobivat peremeestaime ootama (Logi jt., 1998). Kui seenel õnnestub peremeestaim koloniseerida, areneb taimes ja mullas mütseel ning hüüfide tippudes moodustuvad mitmetuumalised spoorid, mis võivad olla kuni 500 µm läbimõõduga (Smith ja Read, 2008). Taimekudedesse pääsevad AM seened läbi risoidide, juurekarvade või epidermaalsete rakkude ning seal leiavad nad tee esikoore rakkudeni (Liu jt., 2007). Taime koloniseerimisel moodustub selle juure epidermise peale apressoorium ehk hüüfi osa mille abil seen tungib taime parenhüümi korteksisse ning saab moodustuda endosümbioos (Gianinazzi-Pearson, 1996).

### **1.3 Arbuskulaarse mükoriisa mõju taimedele agroökosüsteemides**

#### **1.3.1 Toitainelised mõjud**

AM seente oluliseimaks funktsiooniks peetakse mulla toitainete kättesaadavuse parandamist, kuna peentel seenehüüfidel on juurtega võrreldes suurem efektiivne toitainete omastamise pind. See, kuidas taim AM seene kolonisatsioonile vastab, sõltub juure ehitusest ja funktsioonist. Enim kasu sellest sümbioosist saavad jämedate juurtega, madala juurekarvade tiheduse ja lühikeste juurekarvadega taimed, sest seen kompenseerib nende väiksemat absorbeerivat pinda (Smith ja Read, 2008). AM aitab omastada taimele olulisi makrotoitaineid nagu fosfor ja lämmastik, aga ka mikroelemente nagu tsinki, vaske, kaaliumit, kaltsiumi ja rauda (Smith ja Read, 1997; Liu jt., 2000; George jt., 1992; Clark ja Zeto, 2000).

Arbuskulaarsel mükoriisal on tähtis roll fosfori (P) mullast omastamisel, kuna halva lahustuvuse tõttu on see taimele raskesti kättesaadav ning on seetõttu taime kasvu limiteeriv toitaine (Bolan, 1991; Schachtman jt., 1998). Mulla P on tihti seotud keerulise ehitusega orgaaniliste molekulidesse, halva lahustuvusega fosfaatsooladesse või mineraalsetele pindadele (Rausch ja Bucher, 2002). Taimed on võimelised iseseisvalt mullast omastama mineraalset negatiivselt laetud ortofosfaati  $P_i$  ( $H_2PO_4^-$ ), kuid see ammendub juure ümber olevast tsoonist. AM seene hüüfid ulatuvad juurte ümbrusest ammendunud  $P_i$  tsoonist kaugemale ning tänu oma peenele diameetrile, suurele kokkupuutepinnale ja võimele hüdrolüüsida orgaanilist fosforit

aitavad need taimetele tagada fosforiga varustatuse (Wipf jt., 2019). Taim võib kuni 100% fosforist omastada AM seene kaudu, kusjuures taimede poolt kättesaadava fosfori kogus sõltub eelkõige AM seeneliigist (Smith jt., 2003; Smith ja Smith, 2011).

AM seened on olulised ka lämmastiku (N) omastamises. Erinevalt fosforist on üle 90% lämmastikku mullas orgaanilisel kujul ning seega ka AM seentele kättesaamatu - lämmastikuringlust mullas kontrollivad suures osas saprotroofsed seened ja mullabakterid (Craine jt., 2007; Schulten ja Schnitzer, 1997). Lämmastik jõuab mulda läbi õhulämmastikku siduvate bakterite, lämmastiku ladestumise või väetamise. Orgaanilised lämmastikuühendid oksüdeeritakse ammonifikatsiooni käigus ammooniumi ionideks ( $\text{NH}_4^+$ ), mida taimed saavad kasutada. Tavaliselt muudetakse ammoonium nitrifikatsiooni käigus nitraadiks ( $\text{NO}_3^-$ ), mis on kõrge lahustuvusega ja kergesti liikuv, mistõttu on see taimede peamine lämmastikuallikas. Juurevälised hüüfid omastavad pigem ammooniumit, sest see on energeetiliselt efektiivsem (Frey ja Schüepp, 1993; Jin jt., 2005). Lisaks mineraalsele lämmastikule saavad hüüfid mullast omastada ka lihtsaid lämmastikuühendeid, nt. aminohappeid (Whiteside jt., 2012). Kuigi AM seentel pole täheldatud saprotroofset võimet, on neil võime tõsta kaudselt lämmastiku omastamist orgaanilistest N allikatest, sest nad stimuleerivad paljude liblikõieliste kasvu ja nodulatsiooni läbi fosfori omastamise suurendamise ning kiirendavad seega lämmastiku mineraliseerumist (Hodge ja Fitter, 2010).

### 1.3.2 Mitte-toitainelised mõjud

Mitte-toitainelistest hüvedest kõige olulisemaks peetakse AM seentega sümbioosis oleva taime suurenenud resistentsust mullapatogeenide nagu *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium* and *Thielaviopsis* vastu (Cordier jt., 1998; Jung jt., 2012; Pozo jt., 2013; Hayek jt., 2014; Velivelli jt., 2015). Erinevate AM seenetaksonite kaitsevõime varieerub ning sellest võib järeldada, et mitmetest AM seente liikidest koosnevad kooslused on efektiivsemad taimede kaitsevõime suurendamisel võrreldes üheliigilistega (Sikes jt., 2009; Maherali ja Klironomos, 2007). Mehhanismid, läbi mille taime patogeeniresistentsus suureneb, võivad tuleneda taimede biokeemilistest ja füsioloogilistest muutustest, mis on toimunud vastuseks sümbioosile AM seenega. Näiteks suureneb taime hüdrolüütiliste ensüümide kitinaasi, kitosanaasi ja  $\beta$ -1,3-glükonaasi tootmine. Seensümbiondi olemasolul toodab taim rohkem metaboliite nagu fenoolid ja terpeenid, mis samuti vähendavad patogeeni invasiooni intensiivsust (Pozo jt., 2002; El-Khallal, 2007). Kuna juuresisesed patogeenid ja AM seened kasutavad samu fotsosünteesiprodukte, rakuvahelist ruumi ja infektsioonisaite, siis tekib patogeeni ja AM

seente vahel konkurents (Whipps, 2004; Graham, 2001). AM sümbioosiga paranenud taimede toitainete kättesaadavus ning sellest tulenev suurem biomassi tootmine suudab samuti kompenseerida patogeenide tekitatud kahju (Cordier jt., 1996). Lisaks juurtega seotud patogeenide mõju vähenemisele on krohmseentel ka roll herbivooride mõju vähendamisel. Sõltuvalt AM seene liigist mõjutavad nad taime fenotüüpi, pannes need rohkem kaitsekemikaali iridoitset glükosiidi tootma (Bennett jt., 2009). On näidatud, et kolonisatsioon AM seenega võib aidata vältida maa-aluse herbivooria poolt põhjustatud kahjustusi, sest AM suurendab ressursside paigutamist maapealsetesse taimeosadesse ning lisaks suurendab lehtede fenoolide sisaldust (Frew jt., 2020)

On täheldatud, et taimede sümbioos krohmseentega vähendab neis abiootilist stressi. AM seened suurendavad taime vastupidavust põuastressile, sest peened hüüfid omastavad vett ka väiksematest mullapooridest (Augé, 2001). AM seene olemasolu juures suurendab ka taimede vastupidavust liigsest soolsusest tingitud stressile, seda arvatavasti tänu paremale fosfori omastamisele ja ionide homöostaasile. Lisaks suurendavad AM seened ka taimede antioksidantsete ensüümide aktiivsust (Evelin jt., 2009; Hajiboland jt., 2009). AM seenetga sümbioosis olevatel taimedel on kõrgema ensümaatilise aktiivsuse ja suurenenud sekundaarsete metaboliitide sisalduse tõttu ka kõrgem tolerants ekstreemsematele temperatuuridele (Bunn jt., 2009; Chen jt., 2013). Vabade raskemetallide hulk mullas väheneb AM seente kohalolekul, sest seene rakuseina elektrostaatiline negatiivselt laetud mõju raskemetallidele seob need hüüfi külge ning seega takistab nende jõudmist taimekudedesse (Kaldorf jt., 1999).

Liaks biootilise ja abiootilise stressi vähendamisele taimedes on AM seentel otsene mõju mulla struktuurile. Lagunenud hüüfidest jääb mulda glükoproteiin glomaliin, mis tänu oma kleepuvale omadusele aitab tekitada mulla mikro- ja makroagregaatide, mis parandavad mulla veehoiuvõimet, vähendavad mulla tundlikkust erosioonile ning vähendavad toitainete leostumist (Wright ja Upadhyaya, 1997). Stabiilsed mullaagregaadid moodustuvad ka juurevälise mütseeli külge kinnituvatest mullaosakestest. (Smith ja Read, 2008; Asghari jt., 2005). AM soodustav mõju taimejuurestiku arengule aitab samuti kaasa mulla erosioonikindlamaks muutmisel (Gutjahr ja Paszkowski, 2013). Paranenud mullastruktuur, mis talletab paremini toitaineid mullaosakestesse ning hüüfide võime mullast paremini toitaineid kätte saada aitavad vähendada toitainete leostumist mullast ja veekogude eutrofeerumist (Cavagnaro jt., 2015).

## **2. AM seente kasutamine põllumajanduses**

Põllumajanduse intensiivistumine põhjustab mullaelurikkuse kahanemist, kuid kuna mullas elavatel mikroorganismidel on oluline roll agroökosüsteemide toimimisel, põhjustab see omakorda maapealse elurikkuse kadu, erosiooni, kliimasoojenemist ja mullaviljakuse vähenemist (Tsiafouli jt., 2015; Delgado-Baquerizo, 2017). Intensiivsest põllumajandamisest tulenevaid probleeme aitaksid leevendada ökoloogilise võimestamise meetodid ehk mulla elurikkust parandavad praktikad (Bommarco, 2013). Üheks selliseks meetodiks on ka AM seentega inokuleerumine, mis võimaldaks vähendada mineraalväetiste kasutamist ning toimiks ka biotõrjevahendina (Smith ja Read, 2008; Whipps, 2004). Kuigi AM seened on olemas pea kõikides mullaökosüsteemides, sh. agroökosüsteemides, vähendab intensiivne maakasutus nende liigirikkust ja leviste ohtrust mullas (Öpik jt., 2006; Oehl jt., 2010; Jansa jt., 2002).

### **2.1 AM seeni mõjutavad põlluharimispraktikad**

Kuna taimedel on looduslikus ökosüsteemis tavaliselt mitmeid AM seenpartnereid, tuleks rohkem tähelepanu pöörata AM seente kooslustele, mitte ainult sümbioosile ühe taime ja ühe seene vahel. Tundes paremini AM seenekooslusi ning neid mõjutavaid tegureid saab ennustada nende mõju taimede kasvu- ja toitainelistele vastustele. Rakendades sobivaid seenekooslusi soosivaid praktikaid põllumajanduses, oleks võimalik taimede kasvu ja saagikust suurendada (Köhl jt. 2014). Kohaomaseid AM seene liike peetakse eksootilistest mutualistlikumateks, sest nad on kohalikele tingimustele paremini kohastunud (Klironomos, 2003; Middleton jt., 2015). Kultuurtaimeliigid on võrreldes metsikute liikidega vähem AM seentest sõltuvad ning seente päritolu mõjutab nende mükoriisset kasvuvastust vähem kui metsikute liikide puhul (Martín-Robles jt., 2017). Metsikud liigid saavad rohkem kasu kohalikest AM seeneliikidest, seega sobivad need kasutamiseks looduslike ökosüsteemide taastamisel. Sobivaks ja lihtsaks meetodiks oleks kohaliku loodusliku mullaga inokuleerimine (Rua jt., 2016).

Maheviljeluses on AM seente elurikkus ning taimede kolonisatsioon suurem, sest pestitsiidide ja mineraalväetiste kasutamisest hoidumine imiteerib looduslähedasemaid tingimusi (Oehl jt., 2003; Hijri jt., 2006; Bending jt., 2004). Ka intensiivpõllumajanduses

kasutusel olnud põldude AM seente kooslusi on võimalik taastada mahepõllumajandusele ning minimeeritud mullaharimisele üle minnes (Verbruggen jt., 2010). Madala AM seente elurikkusega muldades, sh. põldudel, saab seda taastada ka inokuleerimisega (Maltz ja Treseder, 2015).

Kündmine mõjub AM seente kooslustele halvasti, sest selle tagajärjel lõhutakse hüüfid, häiritakse kevadist spooride idanemist ja talvitumist (Kabir, 2005). Kahjustuse määr oleneb ka kündmise ajast, näiteks sügiskünnil purunevad hüüfid ning mulla liikumisega võivad need sattuda õhu kätte või mattuda sügavale mulda. Kuigi AM seente hüüfid on tavatingimustes suutelised talvituma, vähendab sügisene mullaharimine nende elulemust kuni 50% (Kabir jt., 1997). Kündmise tagajärjel võivad mullas hakata domineerima kiire elukäiguga AM seene liigid, mis on vähem mutualistlikud, sest nad panustavad rohkem ressursse eoste tootmisele ning vähem taimete toitainete transportimisse (Smith ja Smith, 1996).

Suurtes kogustes mineraalväetiste kasutamine vähendab AM seente liigirikkust ja aktiivsust mullas, spooride teket ja juurte kolonisatsiooni, sest suurenenud kättesaadava toitainete hulga tõttu muutuvad taimed AM seenele vähem vastuvõtlikumaks (Douds ja Schenck, 1991; Johnson, 2010; Xiang jt., 2016). Toitainete suure kättesaadavuse tõttu mullas vähendavad taimed oma maa-aluse biomassi hulka ning toetuvad seega vähem AM seentele (Johnson jt., 2013). Sõnniku ja haljasväetiste kasutamine suurendab taimede AM kolonisatsiooni, sest orgaanilisel kujul olevad toitained on taimedele raskesti kättesaadavad ning see soodustab sümbioosi tekkimist (Gryndler jt., 2001; Oehl jt., 2004).

Hästi läbimõeldud viljavaheldus tõstab AM seente liigirikkust ja kolonisatsiooni (Jansa jt., 2006). Juurte kolonisatsioon on suurem põldudel, kus eelneval aastal on kasvatatud mükoriisseid kultuure. Kui eelnevalt on põllul kasvatatud näiteks mittemükoriisseid või vähemükoriisseid kultuure ning kui põld on olnud musta kesa all, on taimede kolonistatsioon madalam ja see võib vähendada ka saagikust (Jansa jt., 2006; Owen jt., 2010). Seega tuleks mittemükoriisete liikide kasvatamine külvikorras hajutada. Kuna AM seened on obligatoorsed sümbiondid, mõjub taimpartnerite puudumine vegetatsiooniperioodil leviste moodustumisele negatiivselt. Seega tuleks umbrohu vähendamiseks kasutatavat musta kesa praktikat vältida (Kabir jt., 1999). Vahekultuuride (kultuurid, mis peale saagikoristust põllule külvatakse ning sinna üle talve jäetakse) kasvatamine parandab mulla viljakust ning võib vähendada umbrohtude arvukust (Clark, 2007). Kuna vahekultuurid on AM seentele peremeheks, siis aitab nende kasvatamine hoida AM seene kooslusi mullas ning võimaldab ka järgmisele kultuurile paremaid mükoriisseid tingimusi (Karasawa ja Takebe, 2012). Lisaks takistab viljavahelduse



ja vahekultuuride kasvatamine kiire elutsükliga ning taimedele vähekasulike või lausa parasiitsete AM seente liikide domineerimist (Johnson jt., 1992).

Pestitsiidide kasutamine võib AM seente kooslustele mõjuda otse läbi taime või kaudselt läbi mullaelustiku. Fungitsiidid lisatakse põllule tavaliselt lehti pritsides, mis mõjutab AM seente elujõulisust vähem kui otse mulda viidud fungitsiid (Diedhiou jt., 2004). On leitud, et taimede kasvule võib fungitsiidide kasutamine samuti negatiivselt mõjuda, sest seensümbiondi puudumisel väheneb samaaegselt patogeenide tõrjumisega ka toitainete omastamine (Dhillion ja Gardsjord, 2004). Herbitsiide lisatakse ka otse mullale, mistõttu on nende mõju AM seentele otsene. Samas pole *in vitro* katsed paljude erinevate pestitsiididega sh. herbitsiididega näidanud nende negatiivset mõju AM seentele (Hage-Ahmed, 2019). Herbitsiidide kaudset negatiivset mõju võib põhjustada peremeestaimede puudumine ja nende vähene mitmekesisus (Lekberg jt., 2017). Glüfosaadil, mida pritsitakse otse lehtedele, on leitud AM seente aktiivsust, spooride elujõulisust ning juurekolonisatsiooni vähendavat mõju, kusjuures mõju tugevus on liigspetsiifiline (Helander jt., 2018; dos Santo Maly, 2006). Metüülbromiid, mida kasutatakse mullapatogeenide ja nematoodide tõrjumiseks ja formaldehüüd, mis on tugev biotsiid, on AM seentele ühed suurima negatiivse mõjuga pestitsiidid, tõrjudes need ajutiselt lausa mullast välja (Jansa jt., 2006).

## 2.2 Tööstuslikud inokulaadid

Ettevõtteid, mis tegelevad AM seeni sisaldavate inokulaatide tootmisega on alates 1990. aastatest turule tulnud mitmeid. Aastaks 2017 oli nende arv Euroopas juba üle 75. Peamiselt on inokulaate tootvad ettevõtted suunatud kohalikule turule ning tooted on mõeldud peamiselt (hobi)aianduses, haljastuses, põllumajanduses ja metsanduses kasutamiseks (Chen jt., 2018). Tooted võivad sisaldada AM seene monokultuuri või erinevate AM seente segakultuuri. Tavaliselt kasutatakse generalistlikke, kiire kasvu ja suure leviste hulgaga liike nagu *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus irregularis*, *Funneliformis. mossae*. Paljudesse toodetesse on lisatud ka ektomükoriisseid seeni, taimekasvu soodustavaid risosfääri baktereid ja erinevaid biolisandeid (biosüsi, kuivatatud vetikaid, aminohappeid, vitamiine), et suurendada toodete efektiivsust ja ka atraktiivsust ostjale (Gianinazzi ja Vosátka 2004; Faye jt., 2013). Biolisandite olemasolu tootes võib mõjutada tarbijaid, kes on niigi meelestatud oma põllul/aias kasutama loodusliku päritoluga kasvustimulaatoreid. Lisaks sisaldavad enamik inokulaate erinevaid kandjaid, milleks tihti on liiv, savi või kompost. Nende toodete kasutuselevõtt põlluharijate poolt on olnud aeglane, seda arvatavasti nende kõrge hinna, kõikuva kvaliteedi ja

efektiivsuse vähese tõendusmaterjali tõttu. AM seentega inokulatsiooni uurinud töödest on paljud potikatsed, mis ei suuda piisavalt täpselt simuleerida kasvutingimusi põllutingimustes ning seetõttu võivad taimede kasvuvastused inokulaadile välitingimustes olla väga erinevad (Faye jt., 2013).

Rowe jt. (2007) ning Vahter ja Nõges (2017) leidsid tööstuslikke inokulaate ja looduslikust mullast tehtud inokulumie võrdlevates katsetes, et mitmed tööstuslikud inokulaadid ei koloniseerinud taime või tegid seda palju vähem kui looduslik muld. Samas leidsid Faye jt. (2013), et 12-st tööstuslikust inokulaadist 10 suutis taimi koloniseerida ning kuigi kaks toodet tõstsid kolonisatsiooni võrreldes loodusliku mullaga statistiliselt oluliselt, siis enamik tooteid ei koloniseerinud juuri looduslikust mullast rohkem ning kaks toodet ei koloniseerinud juuri üldse. Lisaks ei suurenenud ka taimede biomass oluliselt võrreldes loodusliku mullaga. Vahter ja Nõges leidsid, et taimede biomass suurenes tööstuslikke inokulaate kasutades võrreldes negatiivse kontrolliga, kuid loodusliku mullaga inokuleeritud taimede biomassi oli siiski suurem. Tulemuste erinevused võivad tuleneda sellest, et Faye jt. kasutasid kõikide inokulaatide puhul topeltdoosi, ehk leviste hulk potis oli suurem ning seega oli ka kolonisatsioon tõenäolisem tekkima. Looduslik muld on värskem ning sisaldab suurema tõenäosusega rohkem eluvõimelisi leviseid ning seega saavutatakse sellega inokuleerides suurem kolonisatsioon ja sellega kaasnev suurem biomass.

AM seente arvukuse tõstmiseks on lisaks viljeluspraktikate valikule ja tööstuslike inokulaatide kasutamisele ka mitmeid teisi inokuleerimise meetodeid. Lihtsaim meetod mulla AM seente ohtruse tõstmiseks on loodusliku mulla lisamine, kuid lisaks soovitud krohmseentele võidakse introdutseerida ka patogeene ja umbrohuseemneid. Sellist “elava mulla” meetodit kasutatakse näiteks kaevandus- ja muude degradeerunud mullaga alade taastamisel, kus puudub kohalik mullakooslus (Paschke jt., 2003; Schwartz jt., 2006; Vahter jt., 2020). Mükoriisa inokulaate saab toota näiteks potikultuurides, kus toitainevaesesse mulda, kuhu on lisatud ka väike kogus looduslikku mulda või isoleeritud AM seene eoseid ja leviseid, pannakse kasvama taim, mis loob sümbioosi AM seentega ning seega tekitab rohkelt leviseid (Gaur ja Adholeya, 2000). Sellise potikultuuri puhul saab inokulaadina kasutada selle sõelutisi, mulda ja hakitud juuri (Habte ja Osorio, 2001). Looduslikku mulda tuleb selle tööstusliku või potikultuuri toodetud inokulumiga võrreldes madala eoste arvu tõttu lisada inokuleeritavale mullale suurtes kogustes, mille sihtkohta transportimine võib majanduslikult ebamõistlikuks osutada. Potikultuuride kasutamine suures mastaabis pole küll keeruline ega kallis, kuid see on siiski töömahukas ning saadud inkulum võib olla saastunud (Berruti jt., 2015). Samas on vajaminev kogus palju väiksem kui looduslikku mulda kasutades.

Inokulaatide puhaskultuure kasvatatakse ka toitelahuses ilma mullasubstraadita, sest see võimaldab kontsentreeritud inokulumi kergelt kättesaamist ning ristsaastumise risk on madalam (Jarstfer ja Sylvia, 1995). Substraadivaba inokulumi tootmise viis on toitainete voolu tehnoloogia (ingl k. *nutrient flow/film technique*), kus juured kasvavad liikuvast õhukesest toitainelahuse kihis (Elmes ja Mosse, 1984). Hüdroponilises süsteemis on toitelaht liikumatu ning seda aereeritakse, kuid see võib juureväliseid hüüfe kahjustada (Hawkins ja George, 1997). Hüdroponika meetod, mis võimaldab juuri paremini ja ilma vigastamata aereerida on aeropoonika, kus toitainelahust pihustatakse juurtele, on näidanud suuremat potentsiaali AM inokulumi suures mahus toota (Jarstfer ja Sylvia, 1995; Mohammad jt., 2000). Toitainelahusel AM seente kasvatamise vastu räägib asjaolu, et kõiki AM seente liike ei saa toitelahusel kasvatada ning tehnoloogia on kulukas vajamineva tehnoloogia ja energiakulu tõttu.

*In-vitro* paljundusmeetodiks on juur-organ kultuuride kasvatamine, kus bakteril *Rhizobium rhizogenes* abil transformeeritakse taimejuur ning juuri saab kasvatada ilma fotosünteesivate taimeosadeta söötmel. Peale kasvuperioodi lõppu kogutakse eosed kokku (Mugnier ja Mosse, 1987). Suure tootlikkuse tõttu on selle meetodi vastu ka majanduslik huvi. Selline meetodika võimaldab saada puhtaid kultuure, kuid selle kasutamine on kallis, mistõttu sobib see näiteks mikropaljundamise ehk koekultuurist vegetatiivselt istikute paljundamiseks. Juur-organ kultuurid võimaldavad kasvatada mitmeid erinevaid AM seeni, kuid vaid mõned neist toodavad piisavalt leviseid, et neid oleks tasuv kasutada suuremal skaalal inokulumi tootmiseks. *Glomus intraradices* liigigrupi esindajad on suurima leviste tootmisvõimega juur-organ kultuuridel ning seetõttu kasvatatakse neid *in-vitro* paljundusmeetodikatel kõige rohkem (IJdo jt., 2010).

Inokulaatide kasutamisega kaasnevad ka potentsiaalsed ohud: soovimatud tulemused kasvatatavale taimel, otsesed ja kaudsed mõjud liigirikikusele ning negatiivsed mõjud ökosüsteemi funktsioonidele. AM seened ei soodusta taime kasvu kui mulla fosfori sisaldus pole taimekasvule limiteeriv (Ryan ja Graham, 2002). Samuti võib AM luua sümbioosi hoopis umbrohttaimega ning soodustada nende kasvu (Marler jt., 1999). Kohalikud AM seente genotüübid on keskkonnale paremini kohanenud ning pakuvad nende natiivsetele peremeestaimedele rohkem hüvesid. Kui aga uued genotüübid jäävad kohalikele konkurentsile peale, siis võib see ökosüsteemi toimimist muuta (Stahl ja Smith, 1984). Sissetoodud mükoriissid seened mõjutavad kohalikke seenekooslusi ning kaudselt ka taimekooslusi. AM seene olemasolu võib soodustada invasiivsete taimede levikut kui need saavad sümbioosist rohkem kasu kui kohalikud liigid (Schwartz jt., 2006). Hetkel puudub igasugune regulatsioon AM seente ja muude mullaorganismide kasutamisel, reguleeritud on

vaid geneetiliselt muundatud organismide kasutamine. Lisaks teatakse väga vähe krohmseente eri liikide mõjudest ning teadaolevad funktsionaalsed omadused laiendatakse kogu hõimkonnale (Aguilar-Trigueros jt., 2014).

## 3. Materjal ja meetoodika

### 3.1 Inokulaadid

Potikatses kasutasin 11 inokulaati, mis on pärit Euroopa Liidust ning sisaldasid tootekirjelduse põhjal ühe või mitme AM seeneliigi eoseid ja/või muid leviseid. Mitmed inokulaadid sisaldasid lisaks AM seentele ka ektomükoriisseid ning muid taimekasvu soosivaid seeni ja baktereid. Osadele inokulaatidele oli lisatud ka looduslikke väetisi (nt. humaate, vetikaekstrakte, mineraale) ja erinevaid kandjaid (nt. liiv, zeoliit, diatomiid, erinevad savid, vermikuliit). Potikatses kasutatud inokulaadid olid järgmised: Symbivit (Tšehhi), Offyogrow STANDARD (Tšehhi), Offyogrow CONCENTRATE (Tšehhi), Offyogrow TRIC (Tšehhi), Offyogrow MYCODRIP (Tšehhi), Root Better (Suurbritannia), INOQ Advantage (Saksamaa), INOQ Hobby (Saksamaa), INOQ Sprint (Saksamaa); Mycorrhiza Soluble (Austria), Mycorrhiza Granular (Austria). Tootekirjeldused, nende kasutamise võimalused ning täpne koostis on leitud Lisas 1.

### 3.2 Potikatse inokulaatidega

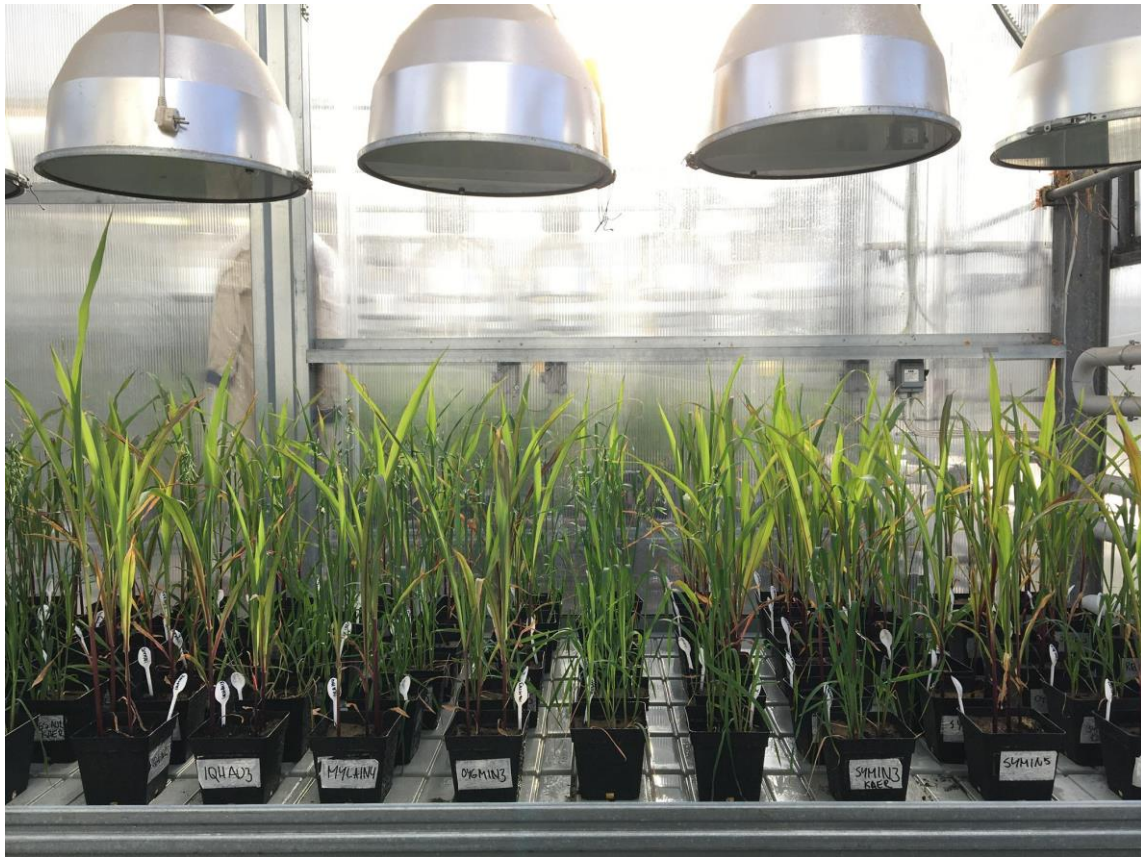
Viisin läbi potikatse, et uurida inokulaatides sisalduvate AM seente mõju taimede biomassidele ning nende võimet taimede juuri koloniseerida. AM seentest tuleneva ning lisatud toitainetest tuleneva mõju eristamiseks võrdlesin autoklaavitud ja autoklaavimata inokulaadi mõju taimede biomassidele. Potikatses kasutasin kahte kõrreliste sugukonda kuuluvat kultuurtaime: hariliku maisi (*Zea mays*) Eesti Taimekasvatuse Instituudi kogust pärit sorti Ungari 1 ning hariliku kaera (*Avena sativa*) sorti „Kusta“. Mõlemaid kultuurtaimi kasvatatakse Eestis ning need moodustavad arbuskulaarset mükoriisat (Wang ja Qiu 2006). Potikatse viisin läbi Tartu Ülikooli Oa tänaval asuvas kasvuhoones 18-28°C ja 40-60% õhuniiskuse juures päevavalguse ja taimekasvulampide käes (16 h päev, 8h öö). Taimede kasvusubstraadiks oli kompostilisandiga must muld (Grass) ning kuni 2 mm läbimõõduga terasuurusega liiv (Silikaat, Eesti) mahusuhtes 1/3. Substraati autoklaaviti 121°C juures 30 minutit, et see steriliseerida ning eemaldada mullamikroobidest tulenevat mõju katsele. Katses oli neli töötlust: tootja poolt

soovitatud kogusega inokuleeritud töötlus, sama kogusega, kuid autoklaavitud inokulaadiga töötlus, positiivseks kontrolliks oli loodusliku mullaga töötlus ning negatiivseks kontrolliks oli ilma inokulaadita steriliseerimata kasvusubstraat. Positiivne kontroll oli segu steriliseeritud kasvusubstraadist ja 100 g looduslikust mullast, mis oli korjatud Tartust niiduilmelisest aiast (58°21'43.5"N 26°40'53.7"E). Mulla kogusin veebruaris, mil spoorid olid läbinud talvise puhkefaasi ning seega olid parema idanemis- ja kolonisatsioonivõimega (Morton jt., 1993). Kuna looduslikus mullas on suure tõenäosusega elujõulisi AM seente eoseid, näitab positiivne kontroll taime vastuvõtlikkust AM seente kolonisatsioonile. Igast töötlustest tegin viis kordust, sealjuures maisi puhul kasutasin kõiki 11 toodet, kuid kaera puhul kuut toodet (Symbiom, Root Better, Offyougrow Standard, INOQ Advantage, Mycorrhiza Soluble, Mycorrhiza Granular). Olin eelnevalt kaerataimedega läbi viinud pilootkatse, kasutades eelpool mainitud 11 inokulaati, kuid ei kaasanud katsesse positiivset kontrolli. Kuna aga pilootkatses ei leidnud ma ühegi toote puhul kaerataimede juurtel kolonisatsiooni, siis valisin põhikatsesse tooted, mis esindasid erinevaid tootjaid ning andsid kaerataimedel parima kasvuvastuse. Käesolevas katses oli kokku 190 potti (120 potti maisitaimedega ja 70 potti kaerataimedega). Igasse potti panin 1 liitri kasvusubstraati, kuhu segasin pealmisesse kihti (5 cm sügavuseni) tootja poolt soovitatud koguse inokulaati (Tabel 1). Kuna inokulaati INOQ Advantage soovitati lisada 1 ml 1000 l mulla kohta, ei olnud iga poti kohta 1 µl väljamõõtmise mõistlik. Seega lisasin igasse potti 1 g toodet.

**Tabel 1.** Potikatses kasutatud inokulaadi kogus igas potis, mis on arvatatud põhinedes tootja poolt soovitatud inokulaadi kogusele (v.a INOQ Advantage)

Inokulaat	Lisatud kogus (g)
Symbivit	15 g
Offyogrow STANDARD	15 g
Offyogrow CONCENTRATE	3 g
Offyogrow TRIC	1 g
Offyogrow MYCODRIP	0,25 g
Root Better	1 g
INOQ Advantage	1 g
INOQ Hobby	20 g
INOQ Sprint	20 g
Mycorrhiza Soluble	0,07 g
Mycorrhiza Granular	2,25 g

Igasse potti külvasin 5 seemet külvisügavusega 4 cm. Seemned olid eelnevalt 1% Domestose lahuses seemnekesta desinfitseerimiseks tund aega leotatud. Viis päeva peale esimeste võsude tärkamist harvendasin taimede arvu potis kolmeni. Potte kastsin üle päeva umbes 0,3 liitri kraaniveega ning randomiseeriti kord nädalas, et vähendada poti asukoha mõju taime biomassile või muudele omadustele. Katse kestis seemnete muldapanekust kuni taimede maha lõikamiseni 74 päeva (Joonis 3). Pottide kastmise lõpetasin 2 nädalat enne katse mahavõtmist. Kaerataimedel eraldasin biomassi kolmeks osaks: juurteks, võsudeks ning valminud teristega pööristeks. Maisitaimedel eraldasin biomassi juurteks ja võsudeks, sest tõlvikuid katse kestel tekkida ei jõudnud. Juurtelt eemaldasid kasvusubstraadi ning pesin need sõelal. Biomassi proovid kuivatasin 50°C juures 2 päeva kuivatuskapis, seejärel kaalusin need.



**Joonis 3.** Potikitse maisi- ja kaerataimedega kasvuhoones (Autori foto).

### 3.4 Juurte värvimine ning mikroskopeerimine

Juured värvisin trüpaansinisega Koske ja Gemma (1989) protokoll järgides. Lõikasin neist mõne sentimeetrised tükid ning kuumutasin neid 15 min 2,5% KOH lahuses 90°C juures, et eraldada juurtest tsütoplasma. Seejärel loputasin juured ning hapestasin neid 4% HCl lahuses 1 h jooksul toatemperatuuril, et tagada värvi kinnitumine. Hapestatud juured värvisin 0,05% trüpaansinise lahusega 15 min jooksul 90°C juures. Peale seda loputasin juured ning panin need toatemperatuuril liigse värvi eemaldamiseks glütseriini lahusesse kuni alusklaasile prepareerimiseni. Juured prepareerisin alusklaasile glütserooli lahuses paralleelselt umbes 0,8 cm lõikudena, igale alusklaasile prepareerisin umbes 10 cm juuri. Juurte kolonisatsiooni määrasin mikroskoobil (Zeiss Axioscope 5) 400x suurendusega, lugedes igalt proovi alusklaasilt 100 vaatevälja ning pannes kirja niitristi läbivad hüüfid, arbuskulid ning vesiikulid järgides McGonigle jt. (1990) protokoll. Selle järgi määrasin iga AM seene struktuuri protsentuaalse esinemine ning üldise juure kolonisatsiooni määra protsentides.



### 3.5 Andmeanalüüs

Andmeanalüüsi viisin läbi tarkvarapaketi R 3.6.1 (R Core Team, 2019). Selleks, et saada teada kas inokuleeritud (IN) taimede kogu biomass ning juure, võsu ja pöörise biomassid olid erinevad sama toote autoklaavitud (AU) töötusega taimede biomassist tegin kahe sõltumatu valimi t-testid. Kuna erinevate toodete ning töötuste biomasside dispersioonid olid erinevad, siis kasutasin Welchi t-testi. Selleks grupeerisin eraldi taimede liigid, töötused (IN ja AU) ja inokulaadid ning tegin t-testid, kus võrdlesin ühe inokulaadiga kasvatatud taimeliigi biomasse IN ja AU töötuse vahel. T-statistik, mis arvutatakse gruppide keskmisi väärtusi, standardhälbeid ning grupi suurust arvesse võttes näitab gruppide erinevust. Mida suurem on selle absoluutväärtus, seda suurem on gruppide keskmine erinevus. T-statistiku negatiivne väärtus näitab, et IN töötusel on suurem biomass ning positiivne väärtus näitab, et AU töötusel on suurem biomass. Töötuste ja toodete biomasside erinevuse visuaalseks hindamiseks tegin ka karpdiagrammid.

### 3.6 Inokulaatide sekveneerimine

Inokulaatides sisalduvate AM seente liikide olemasolu kontrollimiseks ning nende suhtelise ohtruse määramiseks määrati AM seened igas tootes molekulaarsetel meetoditel, kasutades DNA eradamiseks PowerMax<sup>®</sup> Soil DNA Isolation Kit'i ning järgides seejuures Gazol jt. (2016) protokoll. Igast tootest kasutati DNA eraldamise jaoks 5 grammi materjali. AM seente sekventse amplifitseeriti, kasutades selleks polümeraasi ahelreaktsioonis (PCR) neile spetsiifilisi väikese alaühiku ribosomaalse RNA geeni praimereid WANDA (Dumbrell jt., 2011) ja AML2 (Lee ja Young, 2008). PCR viidi läbi kaheosalisena biotehnoloogia ettevõttes Asper Biogene (Tartu, Eesti). Esmalt viidi PCR läbi amplikoni spetsiifiliste praimeritega koos Illumina Nextera adapteritega. Seejärel viidi läbi teine PCR Nextera XT indeks-adapteritega, mille eesmärgiks oli anda igale proovile unikaalne kood, mille järgi neid hiljem bioinformaatilises andmetöötuses ära tunda. Pärast PCR läbiviimist proovid puhastati Agencourt AMPure XP puhastuskitiga. Sekveneerimine viidi läbi Illumina MiSeq platvormil Asper Biogene's, kasutades selleks 2 x 300 bp paired-end tüüpi meetodit. Sekveneerimisel saadud lugemite bioinformaatilise andmetöötuse viis läbi taimeökoloogia töörühma bioinformaatik Martti Vasar. Igale kvaliteedikontrolli läbinud järjestusele leiti vastav virtuaalne

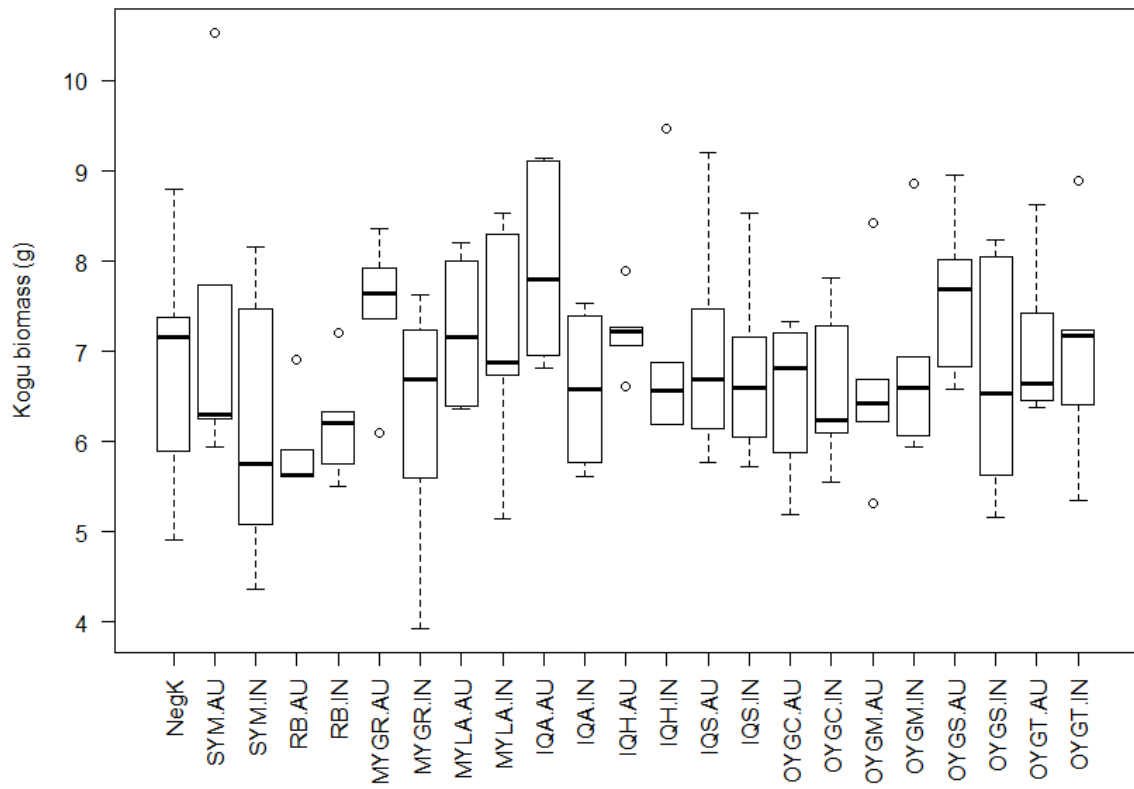
takson (VT) MaarjAM'i andmebaasist (Öpik jt., 2010) BLAST+ programmi abil (v2.5.0, Camacho jt., 2009) kasutades kriteeriumitena 97% identsust ja 95% joondust. Virtuaaltaksonid mis olid esindatud ühe lugemiga, jäeti edasistest statistilistest analüüsides välja.

## 4. Tulemused

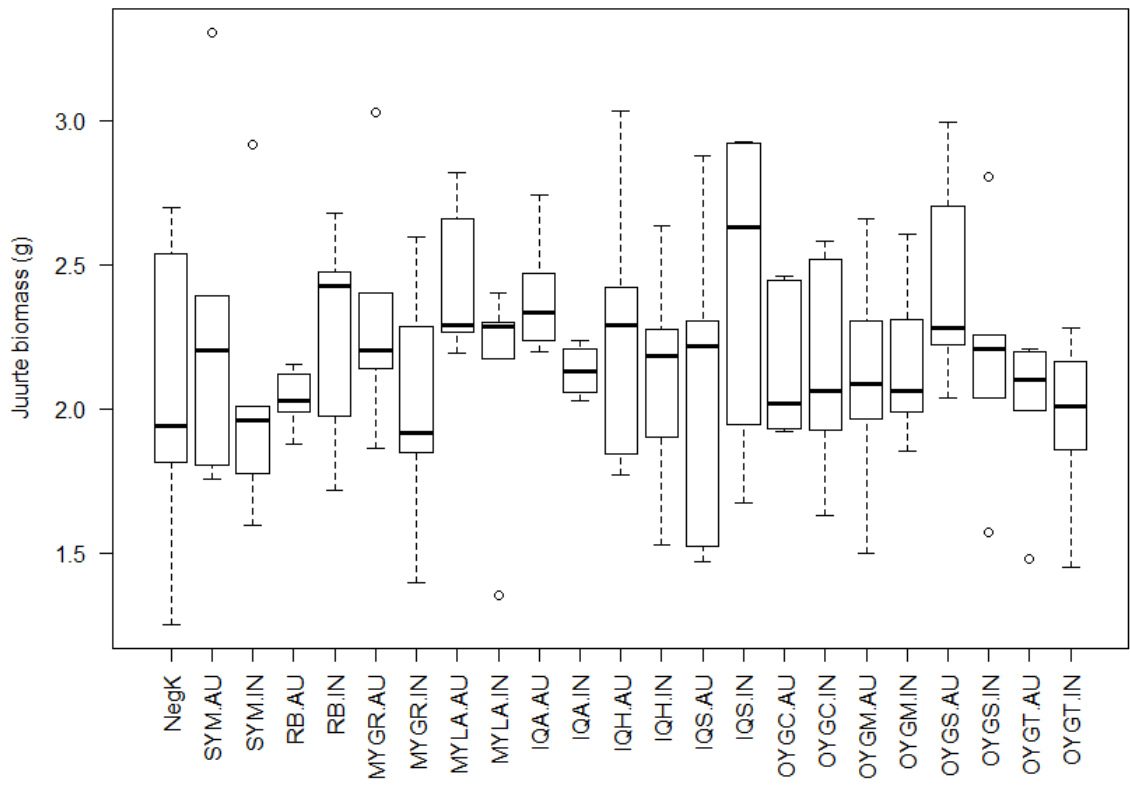
Positiivse kontrolli AM seente kolonisatsioon maisitaimedel oli keskmiselt 8,4%, kõige kõrgem oli kolonisatsioon 20% ning ühes potis kolonisatsiooni ei tuvastatud. Vesiikuleid esines positiivse kontrolli maisi juures keskmiselt 4,4% ulatuses ning arbuskuleid tuvastati kahes potis (4 ja 3%). Positiivse kontrolli keskmine kolonisatsioon kaera juurtes oli 3%, kõige kõrgem oli kolonisatsioon 11% ning kahes potis kolonisatsiooni ei tuvastatud. Vesiikuleid leidis kahes potis (5 ja 3%) ning sama paljudes pottides tuvastati ka arbuskuleid (3 ja 1%). Üheski negatiivse kontrolli taimejuurtes kolonisatsiooni ei olnud. Maisitaimedelt leiti kolonisatsiooni leiti kahe inokulaadiga: Offyougrow Standard, millel oli kolonisatsioon neljas potis ning Offyougrow Concentrate, millel oli kolonisatsioon ühes potis. Offyougrow Standard'i keskmine kolonisatsioon viie poti peale oli 10,4%, kõige kõrgem oli kolonisatsioon ühes potis 20%. Vesiikuleid õnnestus tuvastada kahes potis, kus neid esines ühes potis 1% ja teises 5% ulatuses, kuid ühtegi arbuskulit selle tootega töödeldud juurtest ei leitud. Offyougrow Concentrate'il oli ühes potis kolonisatsioon 22%, lisaks esines seal ka vesiikuleid 2% ning arbuskuleid 8% ulatuses.

T-testide tulemused näitasid, et taimede kogu-, juure-, võsu- ja pähikubiomassid ei erinenud IN ja AU töötluste vahel statistiliselt olulisel määral (Joonis 4-5; Lisa 2, Tabel 1-4). Erandiks oli üks toode (Mycorrhiza Granulated), mille puhul AU töötluses olid kaerataimede juurebiomassid statistiliselt oluliselt suuremad IN töötlusega juurte biomassidest ( $p=0,04$ ,  $t=2,57$ ) (Joonis 5B; Lisa 2, Tabel 2). Keskmiselt andsid veidi suurema kogubiomassi IN töötluses võrreldes AU töötlusega maisitaimedel tooted Root Better, Offyougrow Mycodrip ja Offyougrow Concentrate (Joonis 4A) ning kaerataimedel Symbivit, Root Better ja Offyougrow Standard (Joonis 5A), kuid erinevused ei olnud statistiliselt olulised (Lisa 2, Tabel 1). Üldiselt oli t-statistiku põhjal näha trend, et AU töötlusega pottides kasvanud taimedel olid veidi suuremad biomassid kui IN töötlusega taimedel (Lisa 2, Tabel 1-4). Positiivse kontrolli keskmised kogubiomassid olid maisitaimedel 6,19 g ning kaerataimedel 5,48 g. Negatiivse kontrolli keskmised kogu biomassid olid maisitaimedel 6,83 g ning kaerataimedel 5,85 g. Seega on mõlema taimeliigi puhul loodusliku mullaga positiivse kontrolli kogubiomass steriilselt negatiivse kontrollist väiksem.

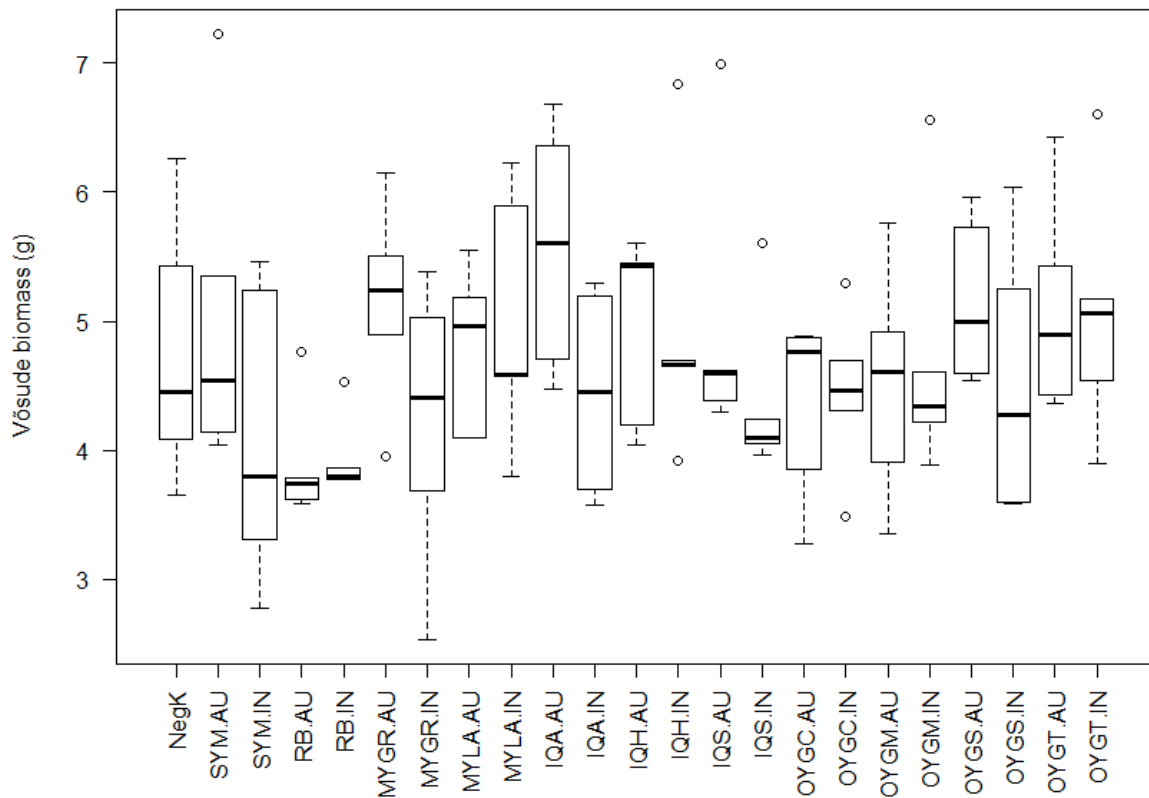
A)



B)

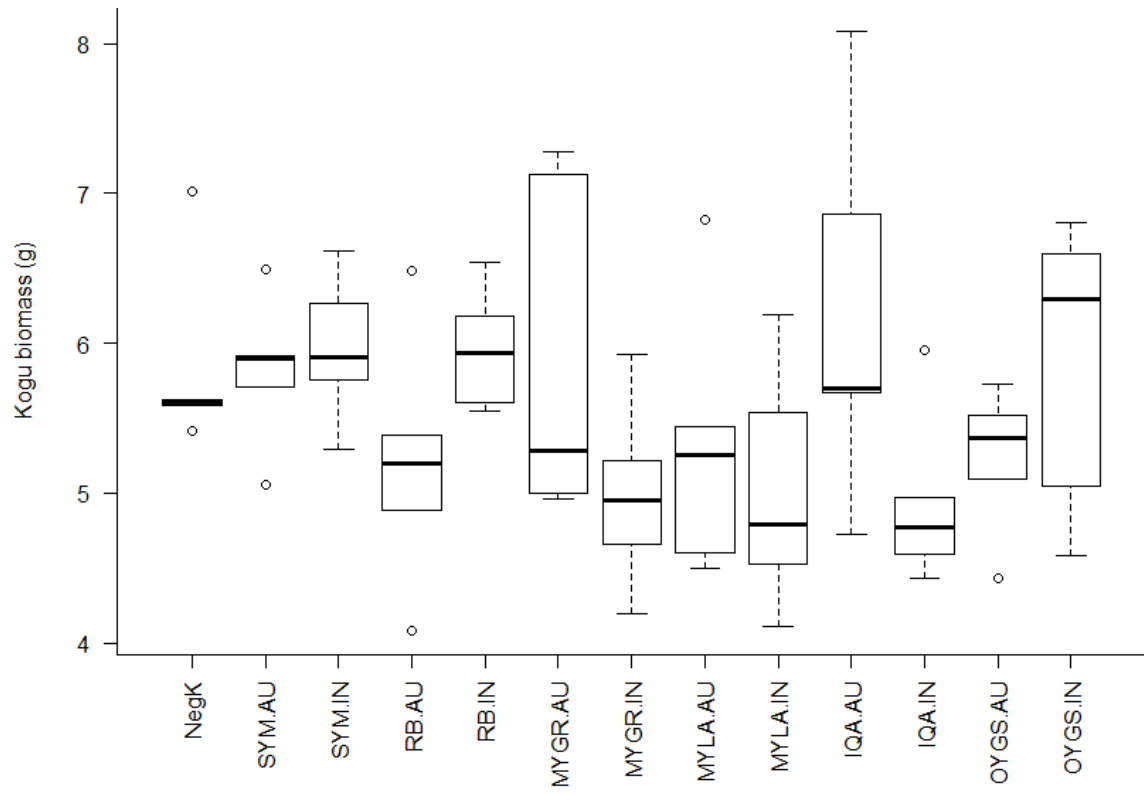


C)

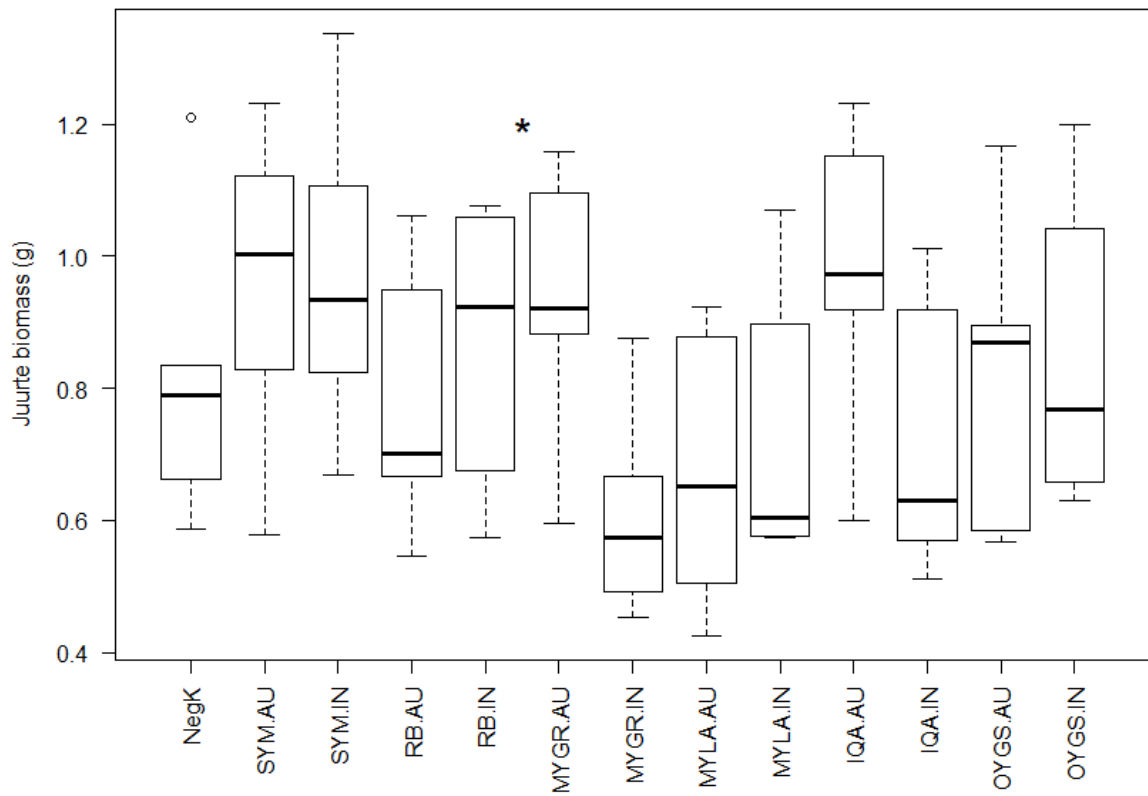


**Joonis 4.** Hariliku maisi A) kogu biomassid, B) juurte biomassid ja C) võsude biomassid negatiivse kontrolli, inokuleeritud (IN) ja autoklaavitud (AU) töötlustes. Karpdiagrammidel on näidatud keskmise joonena mediaanid, karbi alumine piir 25% kvartiili ja ülemine piir 75% kvartiili. Vurrud näitavad biomasside miinimum ja maksimum amplituudi ning väikesed ringid näitavad võõrväärtusi. NegK – negatiivne kontroll; SYM – Symbivit; RB – Root Better; IQA – INOQ Advantage; IQH – INOQ Hobby; IQS – INOQ Sprint; MYGR – Mycorrhiza Granular; MYLA – Mycorrhiza Soluble; OYGS – Offyougrow STANDARD; OYGT – Offyougrow TRIC; OYGM – Offyougrow MYCODRIP; OYGC – Offyougrow Concentrate.

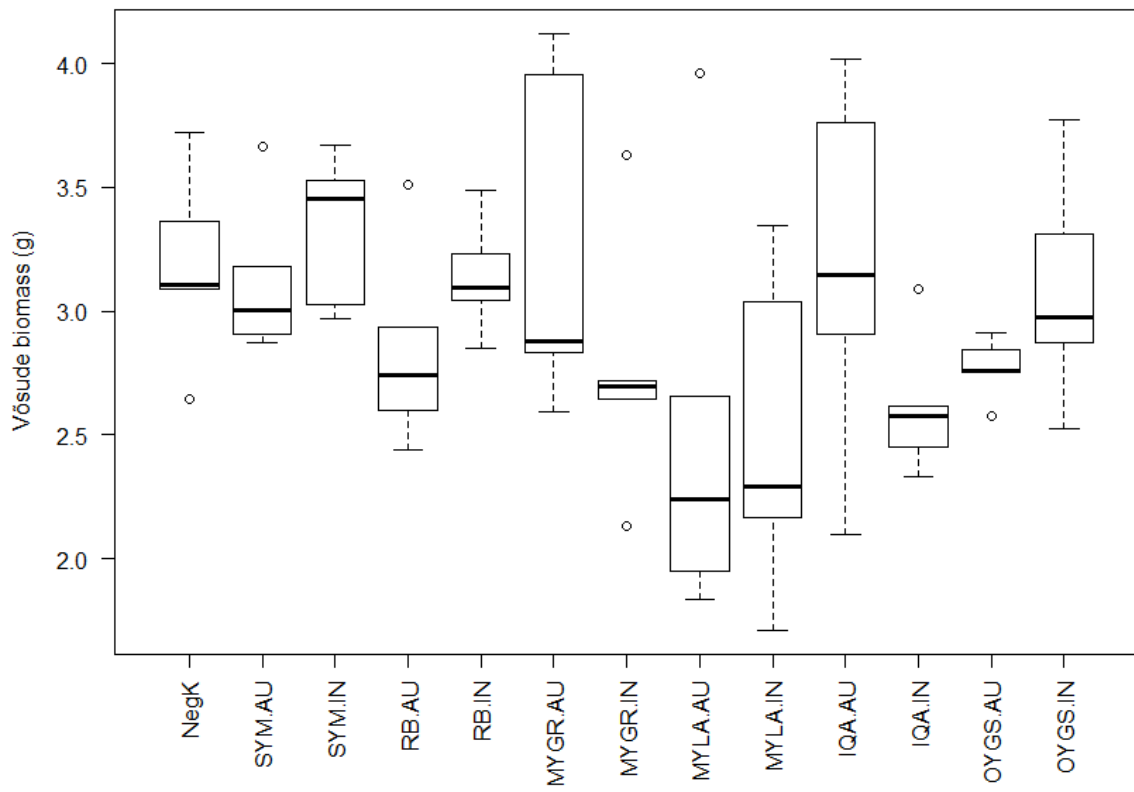
**A)**



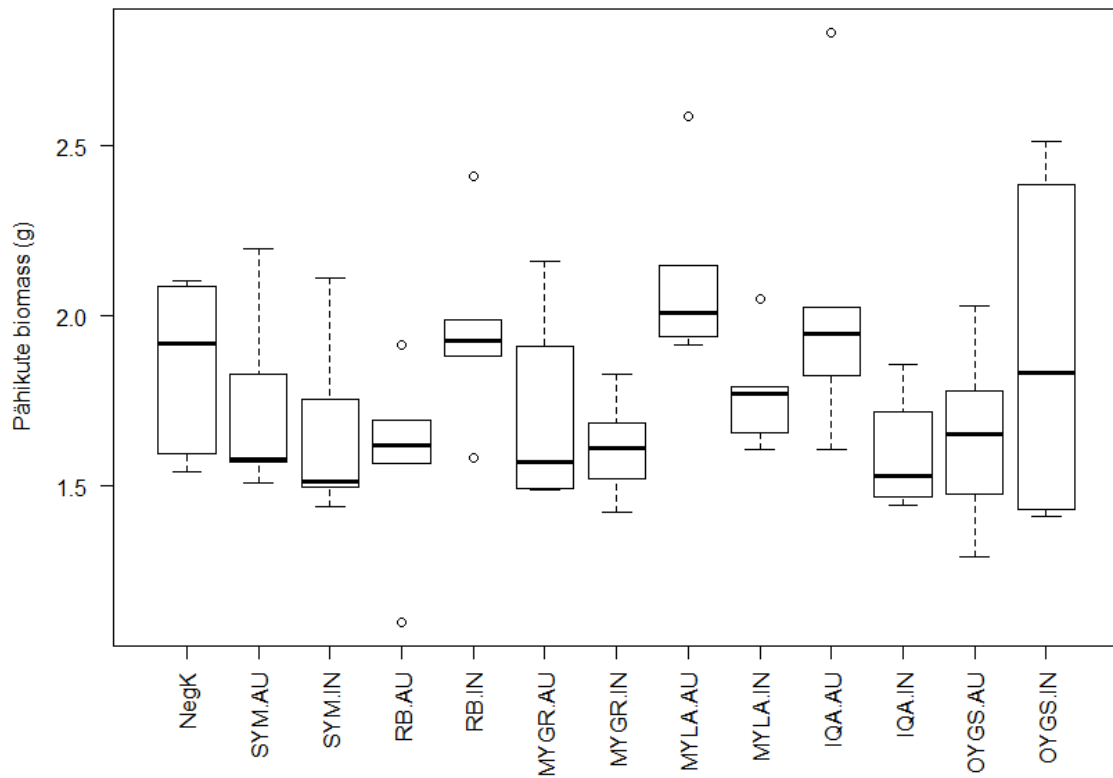
**B)**



C)



D)



**Joonis 5.** Hariliku kaera A) kogu biomassid, B) juurte biomassid ja C) võsude biomassid ja D) pähikute biomassid negatiivse kontrolli, inokuleeritud (IN) ja autoklaavitud (AU) töötlustes. Karpdiagrammidel on näidatud keskmise joonena mediaanid, karbi alumine piir 25% kvartiili ja ülemine piir 75% kvartiili. Vurrud näitavad biomasside miinimum ja maksimum amplituudi ning väikesed ringid näitavad võõrväärtusi. Tärn näitab statistiliselt olulist erinevust IN ja AU töötluste biomasside vahel, p-väärtuse statistilise olulisuse nivooks on  $<0,05$ . NegK – negatiivne kontroll; SYM – Symbivit; RB – Root Better; IQA – INOQ Advantage; IQH – INOQ Hobby; IQS – INOQ Sprint; MYGR – Mycorrhiza Granular; MYLA – Mycorrhiza Soluble; OYGS – Offyougrow STANDARD; OYGT – Offyougrow TRIC; OYGM – Offyougrow MYCODRIP; OYGC – Offyougrow Concentrate.

Bioinformaatiliste andmeanalüüside järel tuvastati inokulaatidest kokku 30 350 AM seene lugemit. Kokku esines proovides 32 erinevat AM seene virtuaaltaksonit (VT) (Tabel 2). Toodete sekveneerimisel saadi enim lugemeid tootel INOQ Advantage (13 524), sellele järgnesid Offyougrow Standard (4868), Offyougrow Mycodrip (4316) ja Offyougrow Concentrate (4202). Tootelt Offyougrow Tric saadi vaid 1 lugem ning tootelt INOQ Hobby ei saadud ühtegi lugemit. Kõige rohkem AM seente virtuaalseid taksonid leiti tootest Offyougrow Concentrate (24 VT), sellele järgnesid tooted Offyougrow Standard (17 VT), INOQ Hobby (11 VT) ja Symbivit (11 VT). Ülejäänud toodetes esines alla 10 VT ning ühest tootest (INOQ Hobby) ei leitud ühtegi virtuaaltaksonit. Sekveneerides leitud ning tootekirjelduses olevad liigid ja nende arvud erinesid suurel määral. Toodetes Offyougrow Concentrate ja Offyougrow Standard vastas sekveneerimistulemustele neli liiki, tootes Symbivit kolm liiki, tootes INOQ Advantage kaks liiki, toodetes Root Better, Mycorrhiza Soluble, Mycorrhiza Granular ja INOQ Sprint vaid 1 liik. Tootes Offyougrow Mycodrip oli tootekirjeldusel olevale ühele liigile lisaks veel kaks liiki. Toodetel INOQ Hobby ja Offyougrow Tric ei kattunud sekveneerimisandmetega ükski liik. Liigid, mis erinevates toodetes vastasid sekveneerimistulemustele olid läbivalt samad, nendeks olid: *Funneliformis mosseae*, *F. geosporum*, *Rhizophagus intraradices* ja *Claroideoglomus claroideum*.



**Tabel 2.** Inokulaatide tootekirjelduses olevad AM seeneliigid ja nende arv ning inokulaatide sekveneerimisel saadud lugemite arv, virtuaalsete taksonite (VT) arv ja neile vastavad AM seeneliigid MaarjAM andmebaasi põhjal (välja on toodud kuni viis arvukamat liiki).

Inokulaat	Toote AM seeneliikide arv	Toote AM seeneliigid	VT arv	Lugemite arv	Sekveneerimisel saadud AM seeneliigid
SYM*	5	<i>Rhizophagus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i> <sup>a</sup> <i>Claroideoglomus claroideum</i> , <i>C. etunicatum</i>	11	334	<i>Claroideoglomus lamellosum/claroideum</i> , <i>Glomus sp</i> , <i>Glomus mosseae</i> <sup>a</sup> , <i>Glomus MO-G17/intraradices</i> <sup>b</sup> / <i>irregulare</i> <sup>f</sup> , <i>Glomus Wirsel OTU16</i>
RB	8	<i>Glomus clarum</i> <sup>h</sup> , <i>G. intraradices</i> <sup>b</sup> , <i>G. mosseae</i> <sup>a</sup> , <i>G. deserticola</i> <sup>i</sup> , <i>G. monosporus</i> <sup>c</sup> , <i>G. brasilianum</i> <sup>d</sup> , <i>G. aggregatum</i> <sup>e</sup> , <i>Gigaspora margarita</i>	4	60	<i>Glomus mosseae</i> <sup>a</sup> , <i>Paraglomus IH1</i> , <i>Glomus sp.</i> , <i>Glomus MO-G22</i>
IQA	3	<i>Rhizoglomus irregulare</i> <sup>f</sup> , <i>Funneliformis mosseae</i> ja <i>F. caledonium</i>	11	13524	<i>Glomus MO-G17/intraradices</i> <sup>b</sup> / <i>irregulare</i> <sup>f</sup> , <i>Glomus sp</i> , <i>Paraglomus IH1</i> , <i>Glomus mosseae</i> <sup>a</sup> , <i>Archaeospora trappei/schenckii</i>
IQH	3	<i>Rhizoglomus irregulare</i> <sup>f</sup> , <i>Funneliformis mosseae</i> ja <i>F. caledonium</i>	0	0	NA
IQS	3	<i>Rhizoglomus irregulare</i> <sup>f</sup> , <i>Funneliformis mosseae</i> ja <i>F. caledonium</i>	4	28	<i>Glomus MO-G17/intraradices</i> <sup>b</sup> / <i>irregulare</i> <sup>f</sup> , <i>Glomus sp.</i> , <i>Diversispora sp.</i> , <i>Glomus Wirsel OTU16</i>
MYGR	3	<i>Glomus intraradices</i> <sup>b</sup> , <i>G. mosseae</i> <sup>a</sup> , <i>G. aggregatum</i> <sup>e</sup>	4	3014	<i>Glomus mosseae</i> <sup>a</sup> , <i>Paraglomus IH1</i> , <i>Glomus coronatum</i> <sup>k</sup> / <i>constrictum</i> <sup>l</sup> / <i>mosseae</i> <sup>a</sup> , <i>Glomus sp.</i>
MYLA	9	<i>Glomus intraradices</i> <sup>b</sup> , <i>G. mosseae</i> <sup>a</sup> , <i>G. aggregatum</i> <sup>e</sup> , <i>G. etunicatum</i> <sup>g</sup> , <i>G. clarum</i> <sup>h</sup> , <i>G.</i>	2	3	<i>Paraglomus laccatum</i> , <i>Glomus mosseae</i> <sup>a</sup>

		<i>brasilianum</i> <sup>d</sup> , <i>G. monosporum</i> <sup>i</sup> , <i>G. deserticola</i> <sup>j</sup> , <i>Gigaspora. margarita</i> ,			
OYGS	5	<i>Claroideoglomerum etunicatum</i> , <i>C. claroideum</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis</i> <i>geosporum</i> , <i>F. mosseae</i>	17	4868	<i>Glomus</i> MO-G17/ <i>intraradices</i> <sup>b</sup> / <i>irregulare</i> <sup>f</sup> , <i>Claroideoglomerum</i> <i>lamellosum/claroideum</i> , <i>Glomus</i> sp., <i>Diversispora</i> sp., <i>Glomus</i> VeGlo18
OYGT	5	<i>Claroideoglomerum etunicatum</i> , <i>C. claroideum</i> , <i>Rhizophagus. irregularis</i> , <i>Funneliformis.</i> <i>geosporum</i> , <i>F. mosseae</i>	1	1	<i>Paraglomerum laccatum</i>
OYGM	1	<i>Rhizophagus irregularis</i>	3	4316	<i>Glomus</i> sp., <i>Glomus</i> MO- G17/ <i>intraradices</i> <sup>b</sup> / <i>irregulare</i> <sup>f</sup> , <i>Paraglomerum</i> IH1
OYGC	5	<i>Claroideoglomerum etunicatum</i> , <i>C. claroideum</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis</i> <i>geosporum</i> , <i>F. mosseae</i>	24	4202	<i>Claroideoglomerum lamellosum/claroideum</i> , <i>Diversispora</i> sp., <i>Glomus</i> sp., <i>Glomus</i> MO-G17/ <i>intraradices</i> <sup>b</sup> / <i>irregulare</i> <sup>f</sup> , <i>Claroideoglomerum Torrecillas12b</i> Glo G5

\*SYM – Symbivit; RB – Root Better; IQA – INOQ Advantage; IQH – INOQ Hobby; IQS – INOQ Sprint; MYGR – Mycorrhiza Granular; MYLA – Mycorrhiza Soluble; OYGS – Offyougrow STANDARD; OYGT – Offyougrow TRIC; OYGM – Offyougrow MYCODRIP; OYGC – Offyougrow Concentrate.

<sup>a</sup> - praegu *Funneliformis mosseae*; <sup>b</sup> - praegu *Rhizophagus intraradices*; <sup>c</sup> - praegu *Funneliformis monosporus*; <sup>d</sup> - praegu *Paraglomerum brasilianum*; <sup>e</sup> - praegu *Rhizophagus aggregatus*; <sup>f</sup> - praegu *Rhizophagus irregularis*; <sup>g</sup> - praegu *Claroideoglomerum etunicatum*; <sup>h</sup> - praegu *Rhizophagus clarus*; <sup>i</sup> - praegu *Funneliformis monosporus*; <sup>j</sup> - praegu *Septoglomerum deserticola*; <sup>k</sup> - praegu *Funneliformis coronatum*; <sup>l</sup> - praegu *Septoglomerum constrictum* (Mycobank andmebaas).

## 5. Arutelu

Suurenenud teadmine intensiivpõllumajanduses kasutatavate praktikate negatiivse mõju kohta elusloodusele on tõstnud huvi jätkusuutlikuma põllumajanduse ning taime- ja mullamikroorganismide vaheliste interaktsioonide vastu (Alori jt. 2017). Ka erinevate biostimulaatorite, sh. AM seeni sisaldavate inokulaatide, tootjate ja tarbijate hulk suureneb iga aastaga (Igiehon ja Babalola, 2017). Samas puuduvad biostimulaatoritele kvaliteedikontrolli nõuded ning erinevad AM seeni sisaldavaid inokulaate võrrelnud teadustööd on jõudnud vastuoluliste tulemustele, kus osades täheldatakse inokulaadi mõjul taimede biomassi ja kolonisatsiooni suurenemist (Lekberg ja Koide, 2005; Hijri, 2016) ning teistes neutraalset või negatiivset mõju taimede biomassile ning kolonisatsiooni madalat taset või puudumist (Rowe jt., 2007; Berruti jt., 2013; Corkidi jt., 2004).

Käesolevas magistritöös testisin tööstuslike AM seeni sisaldavate inokulaatide efektiivsust ja kvaliteeti, mille üheks näitajaks on tekkinud kolonisatsiooni ulatus taime juures. Selle põhjal saab teha järeldusi tootes olevate leviste tiheduse ja nende koloniseerimisvõime kohta. Juurte mikroskopeerimisel leidsin aga, et vaid kaks toodet üheteistkümnest, Offyougrow Standard ja Offyougrow Concentrate, tekitasid maisitaimede juurtes kolonisatsiooni. Tootega Offyougrow Standard oli keskmine kolonisatsioon 10,4% ning tootega Offyougrow Concentrate leidsin kolonisatsiooni vaid ühest potist, kus selle ulatus oli 22%. Positiivse kontrolli keskmine kolonisatsioon maisi- ja kaerataimedel oli madal, vastavalt 8,4% ja 3%, mis võib seletatav olla kogutud mulla madala leviste tihedusega või valitud taimesortide madala vastuvõtlikkusega AM seentele.

Kolonisatsiooni puudumist toodetel, mis sekveneerimisel näitasid AM seente geenide olemasolu, võib seletada leviste eluvõimelisuse puudumisega. See võib olla tingitud ebasobivatest tootmismeetoditest või hoiustamistingimustest. Kuna AM seened on obligatoorsed sümbiondid, mõjub pikaaegne taimpartneri puudumine nende eluvõimelisusele negatiivselt. AM seente leviste hulk tootes võis olla ka väiksem kui lubatud, mis võis samuti tekitada olukorra, kus sümbioosi ei loodud, sest lisatud inokulaadis sisalduvad vähesed eosed ja levised ei puutunud juurega kokku. Faye jt. (2013) kasvasid 12 tööstuslikult toodetud inokulaati potikultuurides ning leidsid nende leviste tihedust mikroskoopiliselt määrates, et paljudes toodetes oli see alla 100 osakese kuupsentimeetri kohta ning kahel tootel ei leitud üldse

leviseid. Madalat leviste tihedust või nende puudumist täheldasid ka Vahter ja Nõges (2017), kes leidsid toodetest Symbivit ja Root Better vastavalt 8 ja 0 eost 50 cm<sup>3</sup> kohta. Seega, kuigi mitmetel inokulaatidel võib pakendil märgitud leviste arv küündida mitmekümne tuhandeni grammi kohta, ei pruugi see tegelikkusele vastata.

Inokulaadis sisalduvate AM seente ja muude mikroorganismide positiivse mõju taime biomassile ehk toote efektiivsuse kontrollimiseks uurisin potikatses, kas tootega inokuleeritud töötuse ja sama toote autoklaavitud töötuse taimede biomassid erinevad. Potikatses kasvasin kahte taimeliiki, milleks olid mais ja kaer. Biomasside erinevused töötuste vahel ei olnud statistiliselt olulised (v.a ühel juhul) ning t-testide tulemustest oli näha trend, et biomasside keskmised olid suuremad hoopis autoklaavitud töötustel. Inokuleerimine ei suurendanud kummagi töötuse puhul märgatavalt taimede biomasse võrreldes negatiivse kontrolliga. Inokulaadil Offyogrow Standard, kus esines kolonisatsioon, olid kogu-, juurte- ja võsude IN töötuse biomassid AU töötuse biomassidest väiksemad, seega kolonisatsioon ei tõstnud maisitaimede biomassi. Ka ühes tootega Offyogrow Concentrate inokuleeritud potis, kus kolonisatsioon esines, ei olnud kogubiomass mitte-koloniseeritud pottide taimede biomassiga võrreldes suurem, kuigi keskmiselt olid selle tootega inokuleeritud töötuse kogu-, juure- ja võsu biomassid autoklaavitud töötuse biomassidest suuremad. Need tulemused viitavad, et antud töö valimisse võetud inokulaatidel oli nendesse lisatud toitainetel suurem mõju kui mikroorganismidel, sh. AM seentel. Inokulaatide kasutamine põllumajanduses ei pruugi oodatud kasu anda ka seetõttu, et neis olevad mikroorganismid võivad pärssida samas tootes ja kasvusubstraadis olevate toitainete omastamist. Samuti võivad inokulaati lisatud mikroorganismid pärssida looduslikus mullas olevate mikroorganismide taimekasvu soodustavaid mõjusid (Faye jt., 2013). Seega tasuks enne suureskaalalist inokulaadiga väetamist katsetada seda väiksematel (põllu)aladel, et kontrollida inokulaadi mõju saagikusele.

Saadud tulemused ei kinnita seega mu kahte esimest püstitatud hüpoteesi, kus arvasin, et ligikaudu pooltes toodetes sisalduvad AM seened koloniseerivad taimi ning sama toote inokuleeritud töötus tõstab rohkem taime biomassi kui autoklaavitud töötus. Sarnaseid tulemusi on saanud ka mitmed varasemased tööd (Rowe jt., 2007; Vahter ja Nõges, 2017; Tarbell ja Koske, 2007), mis näitasid, et tööstuslike inokulaatide AM seened ei pruugi taime koloniseerida või teevad seda vähem kui looduslikus mullas olevad seened ning ka taimede biomass ei tõuse inokuleerimisel oluliselt.

Taimede madal kolonisatsioon võis tuleneda ka valitud taimeliikidest. Eelnevalt tehtud pilootkatses ei leidnud ma ühelgi kaerataimel ühegi tootega inokuleerides AM seente poolt koloniseeritud juuri, samas kui käesoleva katse maisijuurtest leidsin siiski paari toote puhul

vähesel määral kolonisatsioon. Üks põhjustest, miks tänapäeval kasvatatavatel põllukultuuridel on madal kolonisatsioon ning nende kasvuvastus AM seentele on väike võib olla see, et taimi patogeenidele resistentsemaks aretades on vähendatud ka taimede vastuvõtlikkust neile potentsiaalselt kasulikule mükoriisaseentele (Toth jt., 1990). Kuna tavapõllumajanduses kasutatakse suurtes kogustes mineraalväetisi, on ka neil kasvatatavad taimesordid aretatud kõrge toitainesisaldusega muldadel kasvama ning seega vähem AM seentest sõltuma (Hetrick jt., 1992; Zhu jt., 2001). Lehmann jt. (2012) leidsid metaanalüüsis, et peale 1900. aastat aretatud sortidel oli juure kolonisatsiooni tase keskmiselt 30%, samas kui vanematel sortidel oli see 40%. Jätksuutlikuma tuleviku peale mõeldes, kus suund mükoriisa hüvede kasutamisele on suurenenud, võiks taas võtta kasutusele vanemad sordid või aretada uuemad AM seentest sõltuvamad sordid.

Teatud kasvutingimustes, kus mineraalväetiste kasutamise tõttu ei ole taimedele kättesaadav P limiteeritud, võib AM seensümbiondi olemasolu taime kasvu vähendada, seda juhul kui AM seen petab oma partnerit ehk ei paku fotosünteesiproduktide eest piisavalt toitaineid vastu (Lerat jt., 2003). Samas ei saa sellist olukorda ka parasiitseks lugeda, sest seenpartneri mitte-toitainelised hüved on taimele samuti olulised ning sümbioosi kasu võib tulla välja alles spetsiifilistes keskkonningimustes. Käesoleva magistritöö inokulaatide võrdluskatsete edasiarendusena võiks mõõta ka AM seente mitte-toitainelisi hüvesid, näiteks simuleerida taimi minimaalselt kastes põuda ja seeläbi testida, kas AM seened tõstavad taimede põuataluvust. Taimi patogeenidega nakatades saaks testida, kas inokulaadis olevad AM seened tõstavad taimede resistentsust haigustekitajate vastu.

Inokulaatides sisalduvate liikide vastavus tootekirjelduses olevatele liikidele on oluline inokulaadi kvaliteedi näitaja, sest see näitab AM seente tootmisprotsessi puhtust ning tootja panust kvaliteedikontrolli. Käesolevas töös tehtud sekveneerimistulemuste põhjal erinesid tootekirjelduses olevad ja sekveneerimisel saadud liigid suurel määral. Vaid neli liiki (*Funneliformis mosseae*, *F. geosporum*, *Rhizophagus intraradices* ja *Claroideoglomus claroideum*), mis olid tootekirjelduses välja toodud vastasid sekveneerimistulemustele. Mitmes tootes (INOQ Advantage, Offyoutgrow Concentrate, Offyoutgrow Standard) esines rohkem virtuaal-taksonid kui oli tootel lubatud. Selline tulemus võib tuleneda saastumisest AM seente kasvatamise faasis. Mitmel tootel näitas sekveneerimine väga madalat arvu AM seene lugemeid (INOQ Sprint, Offyoutgrow Tric, Mycorrhiza Soluble ja Root Better) ning tootega INOQ Hobby ei saadud ühtegi lugemit. Enim andis lugemeid toode INOQ Advantage. Lugemite olemasolu, kuid kolonisatsiooni puudumine näitab, et tootes on AM seente levisid olemas, kuid need pole elu- või nakatumisvõimelised. Kuna kontrollisin sekveneerimisel ainult AM seente olemasolu,

siis ei saa käesolevate andmete põhjal öelda, kas tootekirjelduses olevad muud kasulikud seened ning bakterid vastasid selles tegelikult sisalduvate liikidega. Mikroskopeerimisel nägin inokuleeritud töötlustes mitmeid struktuure, mis nägid välja nagu *Trichoderma sp.* liigid. Mitmete inokulaatide (Root Better, Mycorrhiza Granular, Mycorrhiza Soluble ja Offyougrow Tric) tootekirjeldustes oli antud seente olemasolu ka märgitud. Lisaks esines inokuleeritud juurtes ka teisi seenestruktuure, samas kui autoklaavitud inokulaatidega töödeldud taime juurtes polnud mingisuguseid struktuure näha.

Varasemad tööd, mis on uurinud tööstuslikes inokulaatides sisalduvaid AM seente liike, on samuti täheldanud mittevastavust tootekirjelduses olevate liikidega. Faye jt. (2013) määrasid morfoloogiliselt 12-s inokulaadis olevate AM seente eoste liigid ning leidsid, et peale nelja liigi, mille seas olid ka *Rhizophagus intraradices* ja *Funneliformis mosseae*, oli vastavusi tootekirjelduses olevate ning mikroskopeerimisel leitud liikide vahel vähe. Sarnasele tulemusele jõudsid ka Berruti jt. (2013), kes leidsid ühte tööstuslikku inokulaati sekveneerides vaid osalist vastavust tootekirjelduses ja sekveneerimistulemustes olevate liikide vahel. Inokulaatide tootjad määravad oma toodetes olevate AM seenete liigid peamiselt morfoloogiliste tunnuste põhjal, kuigi sel viisil oskavad usaldusväärset AM seeni määrata vaid vähesed spetsialistid. Seetõttu tuleks kvaliteedikontrolli protsessi kaasata ka molekulaarne AM seente ja muude mikroorganismide liikide määramine (Berruti jt., 2013; Young, 2012).

Kvaliteetsed, suure levistetihedusega, nakatumisvõimeliste ja hoolikalt valitud AM seente liike sisaldavad inokulaadid võivad sobival muldadel ja keskkonningimustes sobivate kultuurtaimedega soodustada suuremat saagikust. Kvaliteetse inokulaadi kasutamine võib aidata põllupidajatel ka väetiste ja pestitsiidide pealt raha kokku hoida. Näiteks saab inokulaate kasutades vähendada fosforväetise kasutamist kuni 50% (Hijri, 2016; Ceballos jt., 2013). Kuid nagu käesolev töö ning mitmed varasemad tööd on näidanud, puudub paljudel inokulaatidel taimede koloniseerimise võime, nende mõju taimede kasvule ei pruugi olla positiivne ning neis sisalduvad AM seente liigid ei vasta tootekirjelduses olevatele liikidele. Taimekasvatajatel, kes soovivad katsetada AM seente inokulatsiooniga tasuks teha eeltööd toote kohta, mida nad kasutada sooviksid ning toodet väiksemal alal katsetada enne suureskaalalist kasutamist. Potentsiaalselt invasiivsete võõrliikide sissetoomise vältimiseks tuleks valida inokulaadid, milles sisalduvad kohalikule mullakeskkonnale omased liigid. Hetkel on aga teadmised AM seente liikide kohaomasuse kohta alles uurimisjärgus ning põllupidajatelt ei saa eeldada, et nad teaksid, millised AM seened just tema mullale sobiksid. Valimiskriteeriumiks võiks inokulaadi kasutamisel olla ka selles sisalduvate AM seene liikide

mitmekesisus. Mida rohkem on tootes liike, seda suurem on võimalus, et mõni neist sobib kasvatatava taimega ning mulla- ja keskkonna tingimustega ning loob kolonisatsiooni. Samas suureneb ka risk, et mõni liikidest on invasiivne või pärsib teiste mikroorganismide kasulikke mõjusid.

Üheks alternatiivseks mooduseks mulla AM seente liigirikkust ja ohtrust tõsta oleks ka loodusliku mullaga inokuleerimine. Selle meetodi ohuks võib olla patogeensete või taimekasvu vähendavate liikide sattumine mulda ning arvestada tuleks ka loodusliku mulla kogumiskoha ökosüsteemi häirimisest tulenevate negatiivsete mõjudega. Lisaks on loodusliku mulla hulk, mida inokuleerimisel kasutada, palju suurem kui kontsentreeritud inokulaadi või potikultuuride kasutamisel. Ka potikultuuride kasvatamine on taimekasvatajale aeganõudev ning selle meetodi tulemusel saadud AM seente puhtuses ei saa ilma laboratoorsete uuringuteta kindel olla. Seega oleks nii kohalike AM seenekoosluste soosimiseks kui pikas perspektiivis keskkonnale kõige jätkusuutlikumaks variandiks maaharimispraktikate muutmine AM seentele sobivamaks. Sellisteks praktikateks on mineraalsete väetiste kasutamise vähendamine ning nende asendamine orgaanilistega, kündmise ja pestitsiidide kasutamise vähendamine ning vahekultuuride ja läbimõeldud viljavahelduse kasutamine. Kuna need aitavad suurendada AM seente mitmekesisust ja ohtrust mullas, suureneb läbi selle ka mulla elurikkus, mis omakorda aitab toetada maapealset elurikkust (Wagg jt., 2011). Lisaks suurendavad AM seened mulla veehoiuvõimet ning vähendavad toitainete leotumist, mis põllumulla kontekstis on eriti oluline, sest suurem osa veekogudes eutrofeerumist põhjustavad toitained jõuavad sinna just põllumajandusest.

## Kokkuvõte

Arbuskulaarne mükoriisa on pea kõikides ökosüsteemides ja taimesugukondades laialt levinud mükoriisatüüp taime ja *Glomeromycotina* ehk krohmseente alamhõimkonda kuuluvate seente vahel. AM seentel on oluline roll taimede toitainete, eriti fosfori omastamisel, abiootilise ja biootilise stressi vähendamisel ning mulla struktuuri parandamisel. Seetõttu on heas seisus AM seenekooslused olulised kogu ökosüsteemi toimimisele. Tavapõllumajanduses laialtlevinud maaharimispraktikatel nagu mineraalväetiste kasutamine, kündmine ja monokultuuride kasvatamine on aga negatiivne mõju AM seente ohtrusele ja mitmekesisusele. Suurenev arusaam mullaelustiku, eriti AM seente positiivsetest mõjudest taimede kasvule on ajendanud AM seene leviseid sisaldavate biostimulaatorite ehk inokulaatide tootmise ja tarbimise suurenemise. Erinevad inokulaatide koloniseerimisvõimet ning mõju taimede kasvule uurinud tööd on leidnud väga vastuolulisi tulemusi. Inokulaatide vastu kasvava huvi valguses uuringi oma magistritöös 11 tööstusliku inokulaadi näitel potikatses kas: 1) inokulaadid koloniseerivad maisi- ja kaerataimi; 2) inokulaatides sisalduvad AM seened ja muud mikroorganismid suurendavad taimede kogu-, juure-, võsu- ja pähikute biomasse; 3) inokulaatide tootekirjelduses olevad AM seeneliigid vastavad sekveneerimisel leitud virtuaaltaksonitele.

Juurte mikroskopeerimisel leidsin, et vaid kaks toodet tekitasid maisitaimede juurtes kolonisatsiooni. Ka inokuleeritud töötluste taimede kogubiomassid ei tõusnud enamik juhtudel võrreldes autoklaavitud inokulaadi töötlustega ning üldiselt oli märgata hoopis trendi, et autoklaavitud inokulaadiga töötluste biomassid olid suuremad. Sekveneerimistulemused näitasid, et tootekirjelduses ning selles tegelikult sisalduvate AM seente liikide vahel on vähe kattuvusi ning mitmetes inokulaatides on väga vähe või puuduvad täielikult AM seente lugemid. AM seente lugemite olemasolu kuid kolonisatsiooni puudumine on kõnekas tulemus, sest näitab, et paljudes toodetes olevad AM seente levised polnud võimelised kolonisatsiooni tekitama, mille põhjuseks võib olla nende ebasobivatest hoiustamistingimustest tulenev eoste ja hüüfide hukkumine. Kokkuvõtteks saab minu leitud tulemuste põhjal öelda, et käsitletud inokulaadid ei andnud oodatud tulemusi ning vajadus inokulaatide tugevama kvaliteedikontrolli järele on suur, arvestades tõusvat huvi tööstuslike inokulaatide vastu.



## Summary

Arbuscular mycorrhiza is a mutualistic relationship between the fungi belonging to subphylum *Glomeromycotina* and plants that is prevalent in most ecosystems and plant genera. AM fungi have an important role in plant nutrient acquisition, especially phosphorus, reducing and mitigating abiotic and biotic stress and improving soil structure. Because of these benefits, the good condition of AM fungal communities is vital for the functioning of the whole ecosystem. Practices such as excessive use of mineral fertilizers, excessive plowing and growing monocultures in conventional farming have a negative effect on the abundance and diversity of AM fungi. Increasing understanding of the benefits of soil biota, especially of AM fungi on plant growth has prompted the production and use of biostimulants or inoculi containing AM fungal propagules. Different studies have shown contradictory results on the capability of different inoculi to colonize the roots and affect plant growth. In the light of growing interest in inoculi, I examine in my master's thesis on the basis of 11 different products in pot experiment whether: 1) the inoculi colonize the roots of maize and oat plants; 2) AM fungi and other microorganisms in the product increase the whole-, root-, shoot- and grain biomass; 3) the species of AM fungi said to be in the product match the virtual taxa obtained in the sequencing results.

By microscoping the roots I found that AM fungi in only two inoculi had colonized plant roots. The plant whole biomasses of inoculated treatment did not increase in most cases compared to the autoclaved treatment and instead there was a trend of autoclaved treatments having slightly greater biomasses than the biomasses of the inoculated treatments. Sequencing results showed that there were few overlaps between the AM species in the product descriptions and the ones actually found and many inoculi had little or no AM fungal propagules. The presence of sequences from the products but the missing colonization of AM fungi is important evidence because it shows that many AM fungal propagules that were detected in sequencing were not capable of colonizing the roots. This may be caused by loss of viability of the spores and hyphae in unsuitable storage conditions. In conclusion the inoculi that were studied in this work did not produce the expected results and stricter quality control for the inoculi is needed considering the growing interest for commercial inoculi.

## Tänuavaldused

Täna südamest oma juhendajad Inga Hiiesalu ja Tanel Vahterit, kes aitasid mind katse ülesseadmisel ning jagasid töö kirjutamisel väärtuslikku nõu. Veel soovin tänada Jane Oja, kes aitas mind inokulaatide sekveneerimise ja katse ülesseadmise ja ning Martti Vasarit bioinformaatiliste analüüside eest. Olen tänulik ka kõigile neile, kes andsid mulle katse erinevates etappides abikäe!

## Kasutatud kirjandus

- Aguilar-Trigueros, C. A., Powell, J. R., Anderson, I. C., Antonovics, J., Rillig, M. C. (2014) Ecological understanding of root-infecting fungi using trait-based approaches. *Trends in Plant Science* 19: 432-438
- Alori, E. T., Dare, M. O., Babalola, O. O. (2017) Microbial inoculants for soil quality and plant health. *Sustainable Agriculture Reviews* 281-307
- Asghari, H. R., Chittleborough D. J., Smith F. A., Smith . S. E. (2005) Influence of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Symbiosis on Phosphorus Leaching through Soil Cores. *Plant and Soil* 275: 181-193
- Augé, R. M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42
- Augé, R. M. (2004) Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science* 84: 373-381
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M. (1996) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464
- Bending, G. D., Turner, M. K., Rayns, F., Marx, M. C., Wood, M. (2004) Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1785-1792
- Bennett, A. E., Bever, J. D., Bowers, M. D. (2009) Arbuscular mycorrhizal fungal species suppress inducible plant responses and alter defensive strategies following herbivory. *Oecologia* 160: 771-779
- Berruti, A., Borriello, R., Della Beffa, M. T, Scariot, V., Bianciotto, V. (2013) Application of nonspecific commercial AMF inocula results in poor mycorrhization in *Camellia japonica* L. *Symbiosis* 61: 63-76
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., Bianciotto, V. (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. *Front Microbiol* 6: 1559
- Bever, J., Schultz, P., Pringle, A., Morton, J. (2001) Arbuscular mycorrhizal fungi: More diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *BioScience* 51: 923-931

- Biermann, B., Linderman, R.G. (1983) Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 95: 97-105
- Bolan, N. S. (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134: 189-207
- Bommarco, R., Kleijn, D., Potts, S. G. (2013) Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. *Trends in Ecology & Evolution* 28: 230- 238
- Bothe, H. (2012) Arbuscular mycorrhiza and salt tolerance of plants. *Symbiosis* 58: 7-16
- Brundrett, M. C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304
- Bunn, R., Lekberg, Y., Zabinski, C. (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi ameliorate temperature stress in thermophilic plants. *Ecology* 90: 1378-1388
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T. L. (2009) BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421
- Cavagnaro, T. R., Bender, S. F., Asghari, H. R., Heijden, M. G. A. (2015) The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. *Trends in Plant Science* 20: 283-290
- Ceballos, I., Ruiz, M., Fernandez, C., Pena, R., Rodriguez, A., Sanders, I. R. (2013) The in vitro mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. *PLoS One* 8: e70633
- Chen, S., Jin, W., Liu, A. jt. (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increase growth and secondary metabolism in cucumber subjected to low temperature stress. *Scientia Horticulturae* 160: 222-229
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., Reinhardt, D. (2018) Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi - From Ecology to Application. *Front Plant Science* 9: 1270
- Clark, R. B., Zeto, S. K. (2000) Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* 23: 867-902
- Clark, A. (2007) *Managing cover crops profitably*, 3rd edition. U. S. Department of Agriculture, Beltsville
- Chaudhary, V. B., Nolimil, S., Sosa-Hernández, M. A., Egan, C., Kastens, J. (2020) Trait-based aerial dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. nph. 16667

- Cordier, C., Trouvelot, A., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. (1996) Arbuscular mycorrhiza technology applied to micropropagated *Prunus avium* and to protection against *Phytophthora cinnamomi*. *Agronomie* 16: 679-688
- Cordier, C., Pozo, M. J., Barea, J. M., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1017-1028
- Corkidi, L., Allen, E. B., Merhaut, D., Allen, M. F., Downer, J., Bohn, J., Evans, M. (2004) Assessing the infectivity of commercial mycorrhizal inoculants in plant nursery conditions. *Journal of Environmental Horticulture* 22: 149-154
- Craine, J. M., C. Morrow, Fierer, N. (2007) Microbial nitrogen limitation increases decomposition. *Ecology* 88: 2105-2113
- Davison, J., Moora, M., Öpik, M., Adholeya, A., Ainsaar, L., Bâ, A., Burla, S., Diedhiou, A. G., Hiiesalu, I., Jairus, T., Johnson, N. C., Kane, A., Koorem, K., Kochar, M., Ndiaye, C., Pärtel, M., Reier, Ü., Saks, Ü., Singh, R., Vasar, M., Zobel, M. (2015) Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349: 970-973
- Davison, J., Moora, M., Jairus, T., Vasar, M., Öpik, M., Zobel, M. (2016) Hierarchical assembly rules in arbuscular mycorrhizal (AM) fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 97: 63-70
- Davison, J., Garcia de Leon, D., Zobel, M., Moora, M., Bueno, C. G., Barcelo, M., Gerz, M., Leon, D., Meng, Y., Pillar, V. D., jt. (2020) Plant functional groups associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* 226: 1117-1128
- Delgado-Baquerizo, M., Powell, J. R., Hamonts, K., Reith, F., Mele, P., Brown, M. V., jt. (2017) Circular linkages between soil biodiversity, fertility and plant productivity are limited to topsoil at the continental scale. *New Phytologist* 215: 1186-1196
- Dhillion, S. S., Gardsjord, T. L. (2004) Arbuscular mycorrhizas influence plant diversity, productivity, and nutrients in boreal grasslands. *Canadian Journal of Botany* 82: 103-114
- Diedhiou, P. M., Oerke, E. C., Dehne, H. W. (2004) Effects of the strobilurin fungicides azoxystrobin and kresoxim-methyl on arbuscular mycorrhiza. *Journal of Plant Diseases and Protection* 111: 545-556
- dos Santo Maltý, J., Siqueira, J. O., De Souza Moreira, F. M. (2006) Effects of glyphosate on soybean symbiotic microorganisms, in culture media and in greenhouse. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 285-291
- Douds, D. D., Schenck, N. C. (1991) Germination and hyphal growth of VAM fungi during and after storage in soil at five matric potentials. *Soil Biology & Biochemistry* 23: 177-183

- Dumbrell, A. J., Ashton, P. D., Aziz, N., Feng, G., Nelson, M., Dytham, C., Fitter, A. H., Helgason, T. (2011) Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing. *New Phytologist*, 190: 794–804
- Egan, C., Li, D. W., Klironomos, J. (2014) Detection of arbuscular mycorrhizal fungal spores in the air across different biomes and ecoregions. *Fungal Ecology* 12: 26-31
- El-Khallal, S. (2007) Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid & salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Basic Applied Science* 1: 717-732
- Elmes, R. P., Mosse, B. (1984) Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production II Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. *Canadian Journal of Botany* 62: 1531-1536
- Evelin, H., Kapoor, R., Giri, B. (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany* 104: 1263-1280
- Faye, A., Dalpé, Y., Ndung'u-Magiroyi, K., Jefwa, J., Ndoye, I., Diouf, M., Lesueur, D. (2013) Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inoculants. *Canadian Journal of Plant Science* 93: 1201– 1208
- Frew, A., Powell, J. R., Johnson, S. N. (2020) Aboveground resource allocation in response to root herbivory as affected by the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 447: 463-473
- Frey, B., Schüepp, H. (1993) Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytologist* 124: 221-230
- Galli, U., Schüepp, H., Brunold, C. (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 92: 364-368
- Gazol, A., Zobel, M., Cantero, J. J., Davison, J., Esler, K. J., Jairus, T., Öpik, M., Vasar, M., Moora, M. (2016). Impact of alien pines on local arbuscular mycorrhizal fungal communities – Evidence from two continents. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, fiw073
- Gaur, A., Adholeya, A. (2000) Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. *Mycorrhiza* 10: 43-48
- George, E., Häussler, K. U., Vetterlein, D., Gorgus, E., Marschner, H. (1992) Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Botany* 70: 2130-2137
- Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. *The Plant Cell* 8: 1871-1883

- Gianinazzi, S., Vosátka, M. (2004) Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Canadian Journal of Botany* 82: 1264-1271
- Graham., J. H. (2001) What do root pathogens see in mycorrhizas? *New Phytologist* 149: 357-359
- Gryndler, M., Hrselova, H., Vosatka, M., Votruba, J., Klir, J. (2001) Organic fertilization changes the response of the mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi and their sporulation to mineral NPK supply. *Folia Microbiologica* 46: 540-542
- Gutjahr, C., Paszkowski, U. (2013) Multiple control levels of root system remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Plant Science* 4:204
- Habte, M., Osorio, N. W. (2001) *Arbuscular Mycorrhizas: Producing and Applying Arbuscular Mycorrhizal Inoculum*. College of Tropical Agriculture and Human Resources University of Hawaii, Manoa
- Hage-Ahmed, K., Rosner, K., Steinkellner, S. (2019) Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. *Pest Management Science* 75: 583-590
- Hajiboland, R., Aliasgharzadeh, N., Laiegh, S. F., Poschenrieder, C. (2009) Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant Soil* 331: 313-327
- Harinikumar, K. M., Bagyaraj, D. J. (1994) Potential of earthworms, ants, millipedes, and termites for dissemination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Biology and Fertility of Soils* 18: 115-118
- Harner, M. J., Opitz, N., Geluso, K., Tockner, K., Rillig, M. C. (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi on developing islands within a dynamic river floodplain: an investigation across successional gradients and soil depth. *Aquatic Sciences* 73: 35-42
- Hart, M. M., Antunes, P. M., Chaudhary, V. B., Abbott, L. K. (2018) Fungal inoculants in the field: Is the reward greater than the risk? *Functional Ecology* 32: 126-135
- Hawkins, H. J., George, E. (1997) Hydroponic culture of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* with *Linum usitatissimum* L., *Sorghum bicolor* L. and *Triticum aestivum* L. *Plant Soil* 196: 143-149
- Hayek, S., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Franken, P. (2014) Elucidating mechanisms of mycorrhiza-induced resistance against *Thielaviopsis basicola* via targeted transcript analysis of *Petunia hybrida* genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 88: 67-76
- Helander, M., Saloniemi, I., Omacini, M., Druille, M., Salminen, J.P. and Saikkonen, K. (2018) Glyphosate decreases mycorrhizal colonization and affects plant-soil feedback. *Science of the total environment* 642: 285-291

- Hetrick, B. A. D., Wilson, G. W. T., Cox, T. S. (1992) Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces, and ancestors. *Canadian Journal of Botany* 70: 2032-2040
- Hijri, I., Sykorova, Z., Oehl, F., Ineichen, K., Mäder, P., Wiemken A., Redecker, D. (2006) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology* 15: 2277-2289
- Hijri, M. (2016) Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. *Mycorrhiza* 26: 209-214
- Hodge, A., Fitter, A. H. (2010) Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 13754-13759
- Igiehon, N. O., Babalola, O. O. (2017) Biofertilizers and sustainable agriculture: Exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 4871-4881
- Ijdo, M., Cranenbrouck, S., Declerck, S. (2011) Methods for large scale production of AM fungi: past, present and future. *Mycorrhiza* 21:1-16
- Jarstfer, A. G., Sylvia, D. M. (1995) Aeroponic culture of VAM fungi. In: Varma A, Hock B (toim.) *Mycorrhiza*. Springer, Heidelberg, lk 427–441
- Jastrow, J. D., Miller, R. M. (1998) Soil aggregate stabilization and carbon sequestration: feedbacks through organomineral associations, in: Lal R., Kimble J.M., Follett R.F., Stewart B.A. (toim.), *Soil processes and the carbon cycle*, CRC Press, lk 207-223
- Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I. R., Frossard, E. (2002) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234
- Jansa, J., Mozafar, A., Frossard, E. (2003) Long-distance transport of P and Zn through the hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus in symbiosis with maize. *Agronomie* 23: 481-88
- Jansa, J., Wiemken, A., Frossard, E. (2006) The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. *Function of Soils for Human Societies and the Environment* 266: 89-115
- Jin, H., Pfeffer, P., Douds, D., Piotrowski, E., Lammers, P., Shachar-Hill, Y. 2005. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168:687-696
- Johnson, N. C., Copeland, P. J., Crookston, R.K., Pflieger, F. L. (1992) Mycorrhizae: possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. *Agronomy Journal* 84: 387-390



- Johnson, N. C., Graham, J. H., Smith, F. A. (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135: 575-586
- Johnson, N. C. (2010) Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist*, 185: 631-647
- Johnson, N. C., Graham, J. (2012) The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant and Soil*: 1-9
- Johnson, N. C., Angelard, C., Sanders, I. R., Kiers, E. T. (2013) Predicting community and ecosystem outcomes of mycorrhizal responses to global change. *Ecology Letters* 16: 140-153
- Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., Pozo, M. J. (2012) Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology* 38 651-664
- Kabir, Z., O'Halloran, I. P., Fyles, J. W., Hamel, C. (1997) Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal density and mycorrhizal root colonization. *Plant and Soil* 192: 285-293
- Kabir, Z., O'Halloran, I. P., Hamel, C. (1999) Combined effects of soil disturbance and fallowing on plant and fungal components of mycorrhizal corn (*Zea mays* L.) *Soil Biology and Biochemistry* 31: 307-314
- Kabir, Z. (2005) Tillage or no tillage: effect on mycorrhizae. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 23-29
- Kaldorf, M., Kuhn, A. J., Schroder, W. H., Hildebrandt, U., Bothe, H. (1999) Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* 154: 718-728
- Karasawa, T., Takebe, M. (2012) Temporal or spatial arrangements of cover crops to promote arbuscular mycorrhizal colonization and P uptake of upland crops grown after nonmycorrhizal crops. *Plant and Soil* 353: 355-366
- Kivlin, S. N., Hawkes, C. V., Treseder, K. K. (2011) Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 2294-2303
- Klironomos, J. N. (2003) Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84: 2292-2301
- Kobae, Y., Hata, S. (2010) Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant Cell Physiology* 51: 341-353
- Koide, R., Mosse, B. (2004) A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14: 145- 163
- Koske, R. E., Gemma, J. N. (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92: 486-505

- Köhl, L., F. Oehl, van der Heijden, M. G. A. (2014) Agricultural practices indirectly influence plant productivity and ecosystem services through effects on soil biota. *Ecological Applications* 24: 1842-1853
- Lee, J., Lee, S., Young, J. P. W. (2008) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 339-349
- Lehmann, A., Rillig, M. C. (2015) Arbuscular mycorrhizal contribution to copper, manganese and iron nutrient concentrations in crops—A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 81: 147–158
- Lekberg, Y., Koide, R. T. (2005) Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist* 168: 189-204
- Lekberg, Y., Meadow, J., Rohr, J. R., Redneck, D., Zabinski, A. C. (2011) Importance of dispersal and thermal environment for mycorrhizal communities: lessons from Yellowstone National Park. *Ecology* 92: 1292-1302
- Lekberg, Y., Wagner, V., Rummel, A., McLeod, M., Ramsey, P. W. (2017) Strong indirect herbicide effects on mycorrhizal associations through plant community shifts and secondary invasions. *Ecological Applications* 27: 2359-2368
- Lerat, S., Lapointe, L., Piche, Y., Vierheilig, H. (2003) Variable carbon-sink strength of different *Glomus mosseae* strains colonizing barley roots. *Canadian Journal of Botany* 81: 886-889
- Liu, A., Hamel, C., Hamilton, R. I., Ma, B. L., Smith D. L. (2000) Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza* 9: 331-336
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C. D., Harrison, M. J. (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50: 529-544
- Logi, C., Sbrana, C., Giovannetti, M. (1998) Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3473-3479
- Maherali, H., Klironomos J. (2007) Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning. *Science* 316: 1746-8
- Maltz, M. R., Treseder, K. K. (2015) Sources of inocula influence mycorrhizal colonization of plants in restoration projects: a meta-analysis. *Restoration Ecology* 23: 625-634

- Mangan, S. A., Adler, G. H. (2002) Seasonal dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi by spiny rats in a neotropical forest. *Oecologia* 131: 587-597
- Marler, M. J., Zabinski, C. A., Callaway, R. M. (1999) Mycorrhizae indirectly enhance competitive effects of an invasive forb on a native bushgrass. *Ecology* 80: 1180-1186
- Martín-Robles, N., Lehmann, A., Seco, E., Aroca, R., Rillig, M. C., Milla, R. (2018) Impacts of domestication on the arbuscular mycorrhizal symbiosis of 27 crop species. *New Phytologist* 218: 322–334.
- Marschner, P. and S. Timonen. 2005. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology* 28:23-36.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., Swan, J. A. (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501
- Mechri, B., Manga, A. G. B., Tekaya, M., Attia, F., Cheheb, H., Meriem, F. B., Braham, M., Boujnah, D., Hammami, M. (2014) Changes in microbial communities and carbohydrate profiles induced by the mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) in rhizosphere of olive trees (*Olea europaea* L.). *Applied Soil Ecology* 75:124-133
- Middleton, E. L., Richardson, S., Koziol, L., Palmer, C. E., Yermakov, Z., Henning, J. A., Schultz, P. A., Bever, J. D. (2015) Locally adapted arbuscular mycorrhizal fungi improve vigor and resistance to herbivory of native prairie plant species. *Ecosphere*. Ecological Society of America 6: 276
- Mohammad, A., Khan, A. G., Kuek, C. (2000) Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9: 337-339
- Morton, J. B., Bentivenga, S. P., Wheeler, W. W. (1993) Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48: 491-528
- Mugnier, J., Mosse, B. (1987) Vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77:1045-1050
- Nielsen, K. B., Kjøller, R., Bruun, H. H., Schnoor, T. K., Rosendahl, S. (2016) Colonization of new land by arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 20: 22-29
- Nägeli, C., (1842) Pilze im Innern von Zellen. *Linnaea* 16: 278-285

- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Boller, T., Wiemken, A. (2003) Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816-2824
- Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, K., Boller, T., Wiemken, A. (2004) Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138: 574-583
- Oehl, F., Laczko, E., Bogenrieder, A., Stahr, K., Bösch, R., van der Heijden, M. G. A., Sieverding, E. (2010) Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 724-738
- Olsson, P., Thingstrup, A., I., Jakobsen, I., Baath, E. (1999) Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1879-1887
- Owen, K. J., Clewett, T. G., Thompson, J. P. (2010) Pre-cropping with canola decreased *Pratylenchus thornei* populations, arbuscular mycorrhizal fungi, and yield of wheat. *Crop & Pasture Science* 61: 399-410
- Parniske, M. (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6: 763-775
- Paschke, M. W., Redente, E. F., Brown, S. L. (2003) Biology and establishment of mountain shrubs on mining disturbances in the Rocky Mountains, USA. *Land Degradation & Development* 14: 459-480
- Pozo, M. J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J. M., Azcon-Aguilar, C. (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 525-534
- Pozo, M. J., Jung, S. C., Martínez-Medina, A., López-Ráez, J. A., Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M. (2013) Root allies: Arbuscular mycorrhizal fungi help plants to cope with biotic stresses, In 'Progress in symbiotic endophytes'. (toim. R Aroca), Springer: Berlin, Heidelberg, lk 289–307
- R Core Team. (2019) R: a language and environment for statistical computing. <https://www.r-project.org/> (Viimati külastatud 10.08.2020)
- Rausch, C., Bucher, M. (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216: 23-37
- Read, D., Duckett, J., Francis, R., Ligrone, R., Russell, A. (2000) Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Biological Sciences* 355: 815-831
- Reinhardt, D. (2007) Programming good relations – development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinions in Plant Biology* 10: 98-105

- Rillig, M. C., Mummey, D. (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171: 41-5
- Rosendahl, S., McGee, P., Morton, J. B. (2009) Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Molecular Ecology* 18: 4316-4329
- Rowe, H. I., Brown, C. S., Claassen, V. P. (2007) Comparison of mycorrhizal responsiveness with field soil and commercial inoculum for six native montane species and *Bromus tectorum*. *Restoration Ecology* 15: 44-52
- Rua, M. A., Antoninka, A., Antunes, P. M., Chaudhary VB, Gehring C, Lamit LJ, et al. 2016. Home-field advantage? evidence of local adaptation among plants, soil, and arbuscular mycorrhizal fungi through meta-analysis.
- Ryan, M. H., Graham, J. H. (2002) Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant Soil* 244: 263-271
- Schachtman, D. P., Reid, R. J., Ayling, S. M. (1998) Phosphorus uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology* 116: 447-453
- Schulten, H. R., Schnitzer, M. (1997) The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils* 26: 1-15
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421
- Schüßler, A. (2020) *Glomeromycota* phylogeny. (2020)  
[http://www.amf-phylogeny.com/amphylo\\_species.html](http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species.html) (Viimati külastatud 10.08.2020)
- Schwartz, M. W., Hoeksema, J. D., Gehring, C. A., Johnson, N. C., Klironomos, J. N., Abbott, L. K., Pringle, A. (2006) The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecology Letters* 9: 501-515
- Sikes, B. A., Cottenie, K., Klironomos, J. N. (2009) Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. *Journal of Ecology* 97: 1274-1280
- Smith, F. A., Smith, S. E. (1996) Mutualism and parasitism: diversity in function and structure in the “arbuscular” (VA) mycorrhizal symbiosis. *Advances in Botanical Research* 22: 1-43
- Smith, S. E., Smith, F. A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review plant biology* 62: 292-303

- Smith, F. A., Smith, S. E. (2013) How useful is the mutualism-parasitism continuum of arbuscular mycorrhizal functioning? *Plant and Soil* 363: 7-18
- Smith, S. E., Read, D. J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London
- Smith, S. E., Read, D. J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. Academic Press, London
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A. jt. (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108: 1028-1046
- Stahl, P. D., Smith, W. K. (1984) Effects of different geographic isolates of *Glomus* on the water relations of *Agropyron smithii*. *Mycology* 76: 261-267
- Stoate, C., Boatman, N. D., Borralho, R. J., Carvalho, C. R., de Snoo, G. R., Eden, P. (2001) Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management* 63: 337-365
- Zhu, Y. G., Smith, S. E., Barritt, A. R., Smith, F. A. (2001) Phosphorus (P) efficiencies and mycorrhizal responsiveness of old and modern wheat cultivars. *Plant Soil* 237: 249-255
- Tawarayama, K. (2003) Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition* 49: 655-668
- Tsiafouli, M. A., Thebault, E., Sgardelis, S. P. (2015) Intensive agriculture reduces soil biodiversity across Europe. *Global Change Biology* 21: 973-985
- Toth, I. D., Toth, D., Starke, D., Smith, D. R. (1990) Vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of *Zea mays* affected by breeding for resistance to fungal pathogens. *Canadian Journal of Botany* 68: 1039-1044
- Vahter, T., Nõges, M. (2017) Lihtsa krohmseene inokulaadi kasvatamine ning võrdlus kaubanduslike toodetega taimekasvu suurendamiseks. *Agraarteadus* 2: 94-105
- Vahter, T., Bueno, C. G., Davison, J., Herodes, K., Hiiesalu, I., Kasari-Toussaint, L., Oja, J., Olsson, P. A., Sepp, S. K., Zobel, M., Vasar, M., Öpik, M. (2020) Co-introduction of native mycorrhizal fungi and plant seeds accelerates restoration of post-mining landscapes. *Journal of Applied Ecology* [ilmumas]
- Velivelli, S. L. S., Lojan, P., Cranenbrouck, S., Dupré du Boulois, H., Suarez, J. P., Declerck, S., Franco, J., Doyle Prestwich B. (2015) The induction of Ethylene response factor 3 (ERF3) in potato as a result of co-inoculation with *Pseudomonas* sp. R41805 and *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 – a possible role in plant defense. *Plant Signaling & Behavior* 10: e988076.

- Verbruggen, E., Rölting, W., Gamper, H., Kowalchuk, G., Verhoef, H., van der Heijden, M. (2010) Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytologist* 186: 968-979
- Wagg, C., Jansa, J., Schmid, B., Van der Heijden, M. G. A. (2011) Belowground biodiversity effects of plant symbionts support aboveground productivity. *Ecology Letters* 14: 1001-1009
- Wang, B., Qiu, Y.L. (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363
- Whipps, J. M. (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82: 1198-1227
- Whiteside, M. D., Garcia, M. O., Treseder, K. K. (2012) Amino acid uptake in arbuscular mycorrhizal plants. *PLoS ONE* 7:e47643
- Wipf, D., Krajinski, F., Tuinen, D., Recorbet, G., Courty, P. E. (2019) Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist* 233: 1127-1142
- Wright, S. A., Upadhyaya, A. (1997) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198: 97-107
- Wright, D., Read, D., Scholes, J. (1998) Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell and Environment* 21: 881-891
- Öpik, M., Moora, M., Liira, J., Zobel, M. (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778-790
- Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J. M., Reier, Ü., Zobel, M. (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *New Phytologist* 188: 223-241
- Xiang, X. J., Gibbons, S. M., He, J. S., Wang, C., He, D., Li, Q., Ni, Y., Chu, H. Y. (2016). Rapid response of arbuscular mycorrhizal fungal communities to short-term fertilization in an alpine grassland on the Qinghai-Tibet Plateau. *PeerJ* 4: e2226
- Young, J. P. W. (2012) A molecular guide to the taxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 193: 823-826
- Mycobank andmebaas: <http://www.mycobank.org/> (Viimati külastatud 10.08.2020)

# Lisad

## Lisa 1: Tooted

Tšehhi ettevõtte Symbiom'i toodete valikust võtsin oma katsesse viis toodet:

- Symbivit - mõeldud hobiaiaanduses kasutamiseks, sisaldab nelja savikandjat, nelja liiki endomükoriisseid seeni (*Rhizophagus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Claroideoglomus claroideum*, *C. etunicatum*), mükoriisaseente elutegevust toetavaid looduslikke aineid nagu humaate, peenestatud mineraale, kitiini, keratiini, vetikaekstrakte ning pulbristatud biolagunevat polüakrüülamiidi geeli, mis suurendab mulla veepidavust. Leviste tihedust pole tootel märgitud.
- Offyougrow STANDARD - mõeldud põllumajanduses kasutamiseks ning on sertifitseeritud Soil Association Certification Limited poolt mahepõllumajanduses kasutamiseks. Toode sisaldab savikandjaid, kuut liiki endomükoriisseid seeni (*Claroideoglomus etunicatum*, *C. claroideum*, *Rhizophagus irregularis*, *Funneliformis geosporus*, *F. mossae*) tihedusega kuni 325 osakest 1 g kohta. Lisaks sisaldab toode mükoriisaseente elutegevust toetavaid looduslikke aineid nagu keratiin, vetikaekstraktid, sapropeel ehk järvemuda, kitiin, patentkali (Mg ja S sisaldusega kaaliumväetis), dolomiit ja peenestatud looduslikud mineraalid.
- Offyougrow CONCENTRATE - mõeldud põllumajanduses kasutamiseks. Tegu on pulbrilise inokulaadiga, mille osakese suurus jääb alla 500 mikroni ning mis sisaldab kuut liiki AM seeni (*Claroideoglomus etunicatum*, *C. claroideum*, *Rhizophagus irregularis*, *Funneliformis geosporus*, *F. mossae*). Leviste tihedus on 1000 osakest 1 g kohta. Kandjaks on zeoliit.
- Offyougrow TRIC - mõeldud põllumajanduses kasutamiseks, sisaldab kuut AM seene liiki (*Claroideoglomus etunicatum*, *C. claroideum*, *Rhizophagus irregularis*, *Funneliformis geosporus*, *F. mossae*) ning kottseente (*Ascomycota*) hõimkonda kuuluvat fungitiidsete omadustega seent *Trichoderma harzianum*. Toode sisaldab 350



AM seente spoori 1 g toote kohta ning  $5 \times 10^6$  *T. harzianum* kolooniat moodustavat osakest 1 g toote kohta. Kandjamaterjaliks on bentoniidi savi.

- Offyogrow MYCODRIP – mõeldud põllumajanduses kasutamiseks, tegu on tootega, mis lisatakse kasvusubstraadile pinna niisutamise läbi. Toode sisaldab AM seene *Rhizophagus irregularis* spore tihedusega 15 000 1 g kohta. Kandjaks on diatomiid.

Suurbritannia ettevõtte Better Organix toodetest valisin katsesse ühe biostimulandi:

- Root Better – mõeldud nii koduaianduses kui mahepõllunduses kasutamiseks. Tootja pakub erinevaid viise, kuidas taimi inokuleerida- taime ümberistutamise korral tuleb toodet lisada otse juurtele ning istutamisauku, juba kasvavatele taimedele inokulaadi vesilahusega kastes ning taimi seemnest kasvatades tuleb inokulaati kasvusubstraadiga segada.

Toode sisaldab 7 liiki ektomükoriisseid seeni ning 8 liiki AM seeni: *Glomus clarum*, *G. intraadices*, *G. mosseae*, *G. deserticola*, *G. monosporus*, *G. brasilianum*, *G. aggregatum* ja *Gigaspora margarita*. Lisaks AM seentele sisaldab Root Better ka muid seeni ja baktereid, mille liike pole täpsustatud, zeoliiti ning muid mikroelemente. Leviste tihedust pole tootel märgitud.

INOQ GmbH on Saksamaa Pflanzenkulture instituudi alla kuuluv tütarettevõtte, mis toodab erinevaid AM, ektomükoriisseid ning erikoidmükoriisseid seeni sisaldavaid inokulaate põllumajanduses, aianduses ning metsanduses kasutamiseks. Kõiki nende mükoriisaseeni sisaldavaid tooteid võib EÜ Komisjoni määrusega kasutada mahepõllumajanduses. Katsesse võtsin nende tootevalikust kolm inokulaati:

- INOQ Advantage - mõeldud aianduses ning põllumajanduses kasutamiseks. Tegu on kõrge kontsentratsiooniga seemnete katmiseks mõeldud inokulaadiga, mis sisaldab AM seente liike *Rhizoglomus irregulare*, *Funneliformis mosseae* ja *F. Caledonium* kontsentratsioonis 90 000 mükoriisset osakest 1 g toote kohta. Kandja tootel puudub, kuid sisaldab lisaks spooridele väikeses koguses peent vermikuliiti.
- INOQ Hobby – mõeldud hobiaianduses kasutamiseks ning sisaldab AM seente liike *Rhizoglomus irregulare*, *Funneliformis mosseae* ja *F. Caledonium* turvase kandjal. Leviste tihedust ega kandjat pole tootel välja toodud.

- INOQ Sprint - mõeldud muruga kaetud aladel kasutamiseks, sisaldab AM seente liike *Rhizoglyphus irregularis*, *Funneliformis mosseae* ja *F. caledonius* kontsentratsioonis 145 mükoriisset osakest 1 ml toote kohta. Toote kandjaks on 1-2 mm terasuurusega liiv.

Tyrolier Glückspilze on Austria ettevõtte, mis lisaks inokulaatidele toodavad ja turundavad ka seeneekstrakte sisaldavaid toidulisandeid, söödavaid seeni, taimeseemneid ning raamatuid. Katsesse võtsin nende tootevalikust mõlemad inokulaadid:

- Mycorrhiza Soluble – toode on mõeldud vesilahusena substraadile kandes taimede inokuleerimiseks. Inokulaat sisaldab 1 ml kohta 1 975 042 endo- ja ektomükoriissete seente spore, *Trichoderma koningii* ja *T. harzianum* spore ning 19 liiki mullabaktereid. AM seentest sisaldab toode 9 liiki: *Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. aggregatum*, *G. etunicatum*, *G. clarum*, *G. margarita*, *G. brasilianum*, *G. monosporum*, *G. deserticola*.
- Mycorrhiza Granular – toode on mõeldud otse substraadiga segamiseks. Inokulaat sisaldab 1.21 g kohta hinnanguliselt 325,030 spoori endo- ja ektomükoriisset seeni ning *Trichoderma* liike. AM seentest sisaldab toode 3 liiki: *Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. aggregatum*. Lisaks 5 liiki ektomükoriiseid seeni, 2 liiki *Trichoderma* liike ning pruunvetika jahu, huumust, vitamiine ning aminohapped.

## Lisa 2.

**Tabel 1.** T-testi tulemused iga toote inokuleeritud ja autoklaavitud töötuse mõju maisi- ja kaerataimede kogu biomassile. IN ja AU keskmine näitavad nende töötlustega taimede keskmist biomassi grammides. Df tähistab vabadusastmeid ehk sõltumatute muutujate arvu, millega mudelit täielikult kirjeldatakse, t-statistiku absoluutväärtus näitab erinevust gruppide vahel. P-väärtuse statistilise olulisuse nivooks on <0,05.

Liik	Inokulaat	IN keskmine (g)	AU keskmine (g)	df	t-statistik	p-väärtus
Mais	SYM*	6,17	7,35	7,76	1,06	0,32
	RB	6,20	5,93	7,82	-0,69	0,51
	IQA	6,58	7,96	6,94	1,99	0,09
	IQH	7,06	7,21	4,88	0,24	0,82
	IQS	6,81	7,06	7,67	0,31	0,78
	MYGR	6,22	7,48	6,38	1,64	0,15
	MYLA	7,12	7,22	6,77	0,14	0,89
	OYGS	6,72	7,61	7,09	1,18	0,28
	OYGT	7,01	7,10	7,31	0,13	0,90
	OYGM	6,89	6,61	7,99	-0,37	0,72
Kaer	SYM	5,97	5,81	8,00	-0,47	0,65
	RB	5,96	5,21	5,72	-1,74	0,13
	IQA	4,94	6,21	5,66	1,98	0,10
	MYGR	4,99	5,93	6,25	1,57	0,17
	MYLA	5,03	5,33	7,90	0,53	0,61
	OYGS	5,86	5,23	5,93	-1,28	0,25

\*SYM – Symbivit, RB – Root Better, IQA – INOQ Advantage, IQH – INOQ Hobby, IQS – INOQ Sprint, MYGR – Mycorrhiza Granular, MYLA – Mycorrhiza Soluble, OYGS – Offyougrow STANDARD, OYGT – Offyougrow TRIC, OYGM – Offyougrow MYCODRIP, OYGC – Offyougrow Concentrate.

**Tabel 2.** T-testi tulemused iga toote inokuleeritud ja autoklaavitud töötuse mõju maisi- ja kaerataimede juurte biomassile. IN ja AU keskmine näitavad nende töötustega taimede keskmist biomassi. Df tähistab vabadusastmeid ehk sõltumatute muutujate arvu, millega mudelit täielikult kirjeldatakse, t-statistiku absoluutväärtus näitab erinevust gruppide vahel. P-väärtuse statistilise olulisuse nivooks on <0,05.

Liik	Inokulaat	IN keskmine	AU keskmine	df	t-statistik	p-väärtus
Mais	SYM*	2,05	2,29	7,69	0,67	0,52
	RB	2,25	2,03	4,62	-1,20	0,29
	IQA	2,13	2,40	5,59	2,43	0,05
	IQH	2,10	2,27	7,70	0,56	0,59
	IQS	2,42	2,08	8,00	-0,93	0,38
	MYGR	2,01	2,33	7,98	1,13	0,29
	MYLA	2,10	2,45	6,87	1,50	0,18
	OYGS	2,17	2,45	7,87	1,03	0,33
	OYGT	1,95	2,00	7,96	0,22	0,83
	OYGM	2,16	2,10	7,13	-0,26	0,80
	OYGC	2,14	2,15	7,04	0,05	0,97
Kaer	SYM	0,97	0,95	8,00	-0,14	0,89
	RB	0,86	0,78	7,97	-0,55	0,60
	IQA	0,73	0,98	7,93	1,66	0,14
	MYGR	0,61	0,93	7,48	2,57	0,04
	MYLA	0,74	0,68	7,99	-0,48	0,65
	OYGS	0,86	0,82	8,00	-0,27	0,80

\*SYM – Symbivit, RB – Root Better, IQA – INOQ Advantage, IQH – INOQ Hobby, IQS – INOQ Sprint, MYGR – Mycorrhiza Granular, MYLA – Mycorrhiza Soluble, OYGS – Offyougrow STANDARD, OYGT – Offyougrow TRIC, OYGM – Offyougrow MYCODRIP, OYGC – Offyougrow Concentrate.

**Tabel 3.** T-testi tulemused iga toote inokuleeritud ja autoklaavitud töötamise mõju maisi- ja kaerataimede võsude biomassile. IN ja AU keskmine näitavad nende töötlustega taimede keskmist biomassi. Df tähistab vabadusastmeid ehk sõltumatute muutujate arvu, millega mudelit täielikult kirjeldatakse, t-statistiku absoluutväärtus näitab erinevust gruppide vahel. P-väärtuse statistilise olulisuse nivoo on <0,05.

Liik	Inokulaat	IN keskmine	AU keskmine	df	t-statistik	p-väärtus
Mais	SYM*	4,12	5,06	7,91	1,19	0,27
	RB	3,95	3,90	7,02	-0,18	0,86
	IQA	4,45	5,57	6,86	1,82	0,11
	IQH	4,95	4,94	7,11	-0,02	0,99
	IQS	4,39	4,98	6,57	0,99	0,36
	MYGR	4,21	5,15	7,23	1,51	0,17
	MYLA	5,02	4,78	6,83	-0,44	0,67
	OYGS	4,55	5,16	6,56	1,10	0,31
	OTGT	5,06	5,11	7,79	0,09	0,93
	OYGM	4,72	4,51	7,86	-0,33	0,75
OYGC	4,45	4,33	7,91	-0,27	0,80	
Kaer	SYM	3,33	3,13	7,99	-1,01	0,34
	RB	3,14	2,84	6,36	-1,39	0,21
	IQA	2,61	3,19	5,14	1,59	0,17
	MYGR	2,76	3,27	7,49	1,28	0,24
	MYLA	2,51	2,53	7,53	0,04	0,97
	OYGS	3,09	2,77	4,57	-1,48	0,20

\*SYM – Symbivit, RB – Root Better, IQA – INOQ Advantage, IQH – INOQ Hobby, IQS – INOQ Sprint, MYGR – Mycorrhiza Granular, MYLA – Mycorrhiza Soluble, OYGS – Offyougrow STANDARD, OYGT – Offyougrow TRIC, OYGM – Offyougrow MYCODRIP, OYGC – Offyougrow Concentrate.

**Tabel 4.** T-testi tulemused iga toote inokuleeritud ja autoklaavitud töötuse mõju kaerataimede pähikute biomassile. IN ja AU keskmine näitavad nende töötlustega taimede keskmist biomassi. Df tähistab vabadusastmeid ehk sõltumatute muutujate arvu, millega mudelit täielikult kirjeldatakse, t-statistiku absoluutväärtus näitab erinevust gruppide vahel. P-väärtuse statistilise olulisuse nivoo on <0,05.

Inokulaat	IN keskmine	AU keskmine	df	T-statistik	p
SYM*	1,66	1,74	8,00	0,41	0,69
RB	1,96	1,57	8,00	-2,01	0,08
IQA	1,60	2,05	5,15	1,99	0,10
MYGR	1,61	1,72	5,99	0,73	0,49
MYLA	1,78	2,12	6,69	2,37	0,05
OYGS	1,91	1,64	6,18	-1,02	0,35

\*SYM – Symbivit, RB – Root Better, IQA – INOQ Advantage, MYGR – Mycorrhiza Granular, MYLA – Mycorrhiza Soluble, OYGS – Offyougrow STANDARD

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Epp Maria Lillipuu

(23.01.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Arbuskulaar-  
mükorisseid seeni sisaldavad inokulaadid põllumajanduses“,

mille juhendajateks on Inga Hiiesalu ja Tanel Vaher,

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

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

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

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

Tartus, 10.08.2020