



LIHTSA KROHMSEENE INOKULAADI KASVATAMINE NING VÕRDLUS KAUBANDUSLIKE TOODETEGA TAIMEKASVU SUURENDAMISEKS

COMPARING A SIMPLE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGAL INOCULUM WITH COMMERCIAL PRODUCTS FOR ENHANCING PLANT GROWTH

Tanel Vahter¹, Märt Nõges²

¹Tartu Ülikool, Ökoloogia ja Maateaduste Instituut, botaanika osakond, Lai tn 40, 51008, Tartu
²Põllumajandusuuringute Keskus, Teaduse 4/6, 75001, Saku

Saabunud: 27.09.17
Received:
Aktsepteeritud: 08.12.17
Accepted:
Avaldatud veebis: 29.11.17
Published online:
Vastutav autor: Tanel Vahter
Corresponding author:
e-mail: tanel.vahter@ut.ee

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi, agriculture, inoculation, ecological restoration, plant growth.

Link: http://agrt.emu.ee/pdf/2017_2_vahter.pdf

DOI: <https://dx.doi.org/10.15159/jas.17.07>

ABSTRACT. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligate symbionts forming mutualistic relationships with most land-plants. In AM symbiosis, the plant supplies the fungal partner with products of photosynthesis and in return receives various mineral nutrients from the soil. Because of complex interactions with both soil and plants, disturbance can dramatically decrease AMF activity in soils and in these circumstances, it could be useful to restore AMF communities using inoculations. The use of AMF inoculants has so far been minimal due to the high cost and low availability of these products. In this study, the production of simple crude inocula was tested in trap cultures and the most suitable growth substrate nutrient content determined. The effectiveness of the produced inocula was compared with two commercially available inoculants. The results of this study indicate that the best substrate for inocula production in pot-cultures is pure sand with 5% natural soil. When using roots of plants grown in this manner as inoculants, the largest biomass and root-colonisation was achieved. As one of the commercial inoculants did not contain any mycorrhizal propagules at all, the need for quality control and establishment of industry standards is paramount. This study highlights the basics of using AM inoculations in home gardens and small-scale agriculture. The inoculation of large areas is still problematic because of low-yielding inoculant production, but could become highly perspective as methodology improves.

© 2017 Akadeemiline Põllumajanduse Selts. Kõik õigused kaitstud. 2017 Estonian Academic Agricultural Society. All rights reserved.

Sissejuhatus

Intensiivse maaharimise tõttu on muld maailmas läbi aegade suurima surve all. Toiduohutuse ning kõrge tootlikkuse tagamiseks on vaja saagikust kasvatada või vähemalt säilitada, kuid samal ajal minimeerida maaharimise keskkonnamõju, hoidmaks mullaviljakust ka tulevikus (Foley jt, 2011). Selle eesmärgi saavutamise vahendiks on saanud jätkusuutliku intensiivistamise põhimõte (Garnett jt, 2013), milles üha enam pööratakse tähelepanu ka mullaelustikule ning selle bioloogilisele modifitseerimisele (Bender jt, 2016). Kuigi mullaelustiku harmooniline koostöö taimedega on üks põllumajandusliku saagikuse alustaladid, siis intensiivsel maaharimisel mullaelustiku erinevad

funktsionaalsed grupid vaesuvad (Brennan jt, 2006; Verbruggen jt, 2010; McDaniel jt, 2013). Seetõttu nähakse just nende elustikurühmade soodustamises potentsiaali saagikuse kasvuks ning kunstlike sisendite vähendamiseks (Wagg jt, 2014).

Üheks olulisemaks osaks mullaelustikus on arbuskulaarne mükoriisa. Arbuskulaarne mükoriisa, mida kutsutakse ka endomükoriisaks, on kõige laialdasemalt levinud juur-seen assotsiatsoon, mille moodustavad krohmseened ehk Glomeromycotina alam-hõimkonna esindajad taimedega (Spathofora jt, 2016). Teada on, et umbes 80–90% maismaataimi on võimelised mükoriisat looma. Krohmseened on oma olemuselt obligatsed sümbiondid, mis tähendab, et nad ei ole võimelised oma elutsükli läbi viima ilma peremeesorganismi ehk

taimeta. Üldise arusaama kohaselt toimub mükoriisa kaudu süsinikühendite transport taimelt seenele ja vastutasuks saab taim seenelt mitmesuguseid mineraalseid toiteaineid (eelkõige fosfor ja lämmastik) ning kaitset mitmekülgse biotilise- ja abiootilise stressi suhtes (Smith, Read, 2008). Lisaks otsesele toiteainete ülekandest tingitud kasule on krohmseened võimelised taime kasvu panustama ka läbi mulla struktuuri parandamise (Leifheit jt, 2014). Selle peamiseks vahendiks on seenehüüfide koostises olev glükoproteiin glomaliin, mis pärast hüüfide lagunemist mulda jääb ning peenosakesi suuremateks agregaatideks seob (Wright, Upadhyaya, 1997). Seeläbi suureneb mulla õhustatus ja veemahutavus ning väheneb mullaerosioon.

Krohmseente ja taime vahelise sümbioosi ökoloogia on uute teadmiste lisandudes pärinud palju tähelepanu mitte ainult teadlaskonnalt, vaid järjest enam ka taimekasvatajatelt. Fundamentaaluuringud on loonud võimekuse krohmseeni kasutada praktilistes probleem-olukordades, kus inimõjust tingitud häiringute tõttu on kahanenud mulla viljakus ja bioloogiline aktiivsus, pärsitud on taimekasv ning põllumajanduslikes süsteemides vähenenud saagikus (Berruti jt, 2015; Siddiqui jt, 2008).

Kuna krohmseened sõltuvad täielikult taimedest, on nad ka majandamisõrnad ning häiringute järgselt aeglaselt taastuvad. Seepärast on otsitud võimalusi krohmseente arvukuse tõstmiseks ja nende poolt osutatavate ökosüsteemiteenuste taastamiseks nii maaharimisvõttega kui ka inokulatsiooniga ehk seeneleviste mulda lisamisega (Vosatka jt, 2012). Inokulatsioon kui kiiretoimeline ja otsene meede on lootustäratav viis krohmseente arvukuse tõstmiseks, kuid tootmise keerukuse tõttu on inokulaadid endiselt kallid. Samuti ei soosi inokulaatide tootmismahud, hind ja regulatsioonide puudumisest tingitud ebahühtlane kvaliteet nende suuremahulist kasutamist. Seetõttu sooviti käesoleva uuringu raames uurida krohmseente kasvatamise meetodikat, laiema eesmärgiga muuta nende kasutamine kättesaadavamaks. Uuringu põhieesmärgid olid seega järgmised: (1) selgitada välja sobivaim kasvustruktuuri koostis looduslikust mullast pärit krohmseente paljundamiseks potikultuurides (2) võrrelda potikultuurides toodetud lihtsa inokulaadi efektiivsust kommerts-inokulaatidega.

Materjal ja meetodika

Inokulatsioonimaterjali kogumine ja ettevalmistus

Krohmseente paljundamiseks (edaspidi paljunduskatse) oli esmalt tarvis koguda looduslikku mulda, millel oleksid head inokulaadi omadused, nagu krohmseente liigirikkus ja leviste arvukus. Tuginedes varasemalt Põllumajandusuuringute Keskuses tehtud glomaliini sisalduse mõõtmistele, eeldati et parimat potentsiaali eoste kogumiseks omab alvarite niidukooslus. Inokulatsioonimaterjal koguti 17. jaanuaril 2015. aastal Rabivere maastikukaitsealal Kõnnu tamme lähiselt (59°07'01.7" N; 24°45'03.15" E) niidult, umbes kümne ruutmeetri suuruselt alalt.

Proovikohas oli mullaliigiks õhuke paepealne muld (Kh^m) liivsavi lõimisel. Taimkatte klassifikatsioonilt kuulub proovikoht looniitide ehk alvarite tüübiriühma (Paal, 1999). Mulla pinnalt eemaldati lumekiht ja selle all olev mõne sentimeetri paksune rohukamar. Muld koguti kuni 20 cm sügavuseni. Kogutud muld kuivatati toatemperatuuril laiali laotatult, vahepeal mulda segades. Kuivatatud muld purustati ja sõeluti mullaproovide ettevalmistamise standardi järgi (ISO 11464, 2006). Purustamine ja sõelumine aitab inokulaati homogeniseerida ning võimaldab ühtlasemat doseerimist. Saadud inokulaati nimetatakse edaspidi KT (Kõnnu Tammed järgi). Kuna jaanuarikuus ei ole Eestis aktiivne vegetatsiooniperiood, oli enamik krohmseeni mulla kogumise ajal eostena säilitusfaasis, mis tegi võimalikuks ka nende kvantifitseerimise. Eoste ekstraheerimiseks kasutati märga sõelumist ja sahharoosi gradiendil tsentrifuugimist (Furlan jt, 1980). Eoste kogus proovis arvutati eoste loendamisega mikroskoobi vaateväljades ning ekstrapoleerides tulemust kogu proovi peale (Read jt, 1976; Bierman, Linderman, 1981). Kogutud mullas oli loendamise tulemusena umbes 12 eost g⁻¹. Vaatamata teatavale ebatäpsusele, võib kogutud mulla leviste sisaldust lugeda kõrgeks. Alvarite arbuskulaarse mükorrisatsiooni kõrget taset Eestis on varasemalt esile tõstnud ka Gerz jt. (2015).

Potikultuurid

Potikatse taimeks valiti magus mais (*Zea mays* var. *saccharata*). Maisi on kasutatud üle maailma paljudes krohmseentega tehtud uuringutes, kuna ta loob toiteainete omastamiseks mükoriisat ning on lihtsasti kättesaadav ja kasvatatav tehnilikes tingimustes. Potikatset viidi läbi Põllumajandusuuringute Keskuse fütotronis. Fütotronis kasutati vastavalt pottide hulga 8 (12 potti) ja 12 (32 potti) 400 W luminofooriga kõrgrõhuelavhõbelampi. Keskmiseks valgustugevuseks pottide kõrgusel mõõdeti 22 500 lux-i (~275 µmol m⁻² s⁻¹). Päeva pikkuseks seati 16 tundi vastavalt maisikasvatuse soovitudele tehistingimustes (Eddy, Hahn, 2010). Ruum oli varustatud temperatuur-reguleeritava õhu sisse- ja väljatõmbega vajaliku temperatuuri tagamiseks. Temperatuuri jälgiti logiva *iButton* (Maxim Integrated) abil kogu katseperioodi vältel. Keskmiseks temperatuuri käiguks mõõdeti ööpäevase tsükli jooksul 21–30 °C.

Kasvustraadina kasutati kõikides katsetes Kekkilä AS madala fosforisisaldusega (NPK 5-1-5, pH 6,2) mahetootmisesse sobivat kasvumulda, mida lahjendati Silikaat AS < 0,8 mm terasuurega kuivliivaga. Mahe kasvumuld soosib krohmseente kasvu kuna sinna pole lisatud mineraalseid väetisi ning muid agrokemikaale (Verbruggen jt, 2010). Samuti võimaldab see vajadusel inokulaati kasutada maheviljeluses. Kõik katsed viidi läbi kahe liitristes plastpottides.

Paljunduskatse

Krohmseente paljundamise katses oli kokku 12 potti, milles kolm erinevat töötlust neljas korduses. Töötlustena kasutati 1/3 ja 1/4 mahusuhtes komposti ja liiva

segu ning ainult liiva. Kõik potid inokuleeriti 100 ml homogeniseeritud KT mullaga. Maisitaimed eelidandati nelja ööpäeva jooksul idandamiskambris. Seejärel valiti välja edukamad idandid ning istutati šablooni abil 20 tükki igasse potti 2 cm sügavusele. Viie päeva möödudes harvendati taimede arv pottides 14-ni. Lõplik taimede hulk kujunes vähima edukalt kasvama läinud taimede arvu järgi ühes potis. Taimi kasteti kraaniveega vastavalt vajadusele, enamasti iga 4 päeva tagant. 12 nädala möödumisel lülitati välja valgustus ning lõpetati kastmine. Seejärel koguti pottidest juureproovid kolonisatsiooni määramiseks ning pakendati muld kilekottidesse. Kilekotid mullaga säilitati temperatuuril +4 °C kuni edasise töötlemiseni. Juureproovid selgitati ja värviti kogumise päeval (Koske, Gemma, 1989).

Võrdluskatse

Katsetatud inokulaatideks olid Tšehhi (edaspidi Toode 1) ja Suurbritannia (edaspidi Toode 2) päritolu kommertstooted ning paljunduskatses kogutud juured erinevates doosides (tabel 1). Katsesse kaasati ka inokuleerimata kontrollpotid. Kõik töötused olid neljas korduses (kokku 32 potti) ning kõikides pottides kasutati substraadina kasvumuld ja liiva mahusuhetes 1/3-le. Katse kestvust lühendati võrreldes paljunduskatsega 6 nädalani, juhaks kui kasutatavad inokulaadid osutuvad väga infektiivseteks ning kõrge juurekolonisatsioon peaks erinevusi töötluste vahel tasandama. Seemnete idandamine ja istutamine toimus sarnaselt paljunduskatsele, kuid istutatud idandite hulka vähendati üheksani, mis seejärel harvendati viie taimeni poti kohta, eesmärgiga tekitada taimedele optimaalsem kasvukeskkond ning vähendada liigest istutustihestusest tingitud stressi.

Tabel 1. Võrdluskatse ülesehitus. Katse kestvus: 6 nädalat. Kasvsubstraadiks oli mahusuhetes 1/3-le kasvumuld ja liiv. Kõik töötused olid neljas korduses.

Table 1. Structure of the comparative experiment. Duration of experiment: 6 weeks. Growth substrate used was 1/3 compost and sand. All treatments were replicated 4 times.

Inokulaat / Inoculant	Lisatud kogus / Quantity added
Inokuleerimata / Un-inoculated	–
Toode / Product 1	½ doosi / dose, 10 g
Toode / Product 1	1 doosi / dose, 20 g
Toode / Product 2	½ doosi / dose, 3,75 g
Toode / Product 2	1 doosi / dose, 7 g
Juured / Root inoculum	0,5 g
Juured / Root inoculum	1 g
Juured / Root inoculum	1,3 g

Inokulaadina kasutati kolme erinevat materjali:

- Paljunduskatses pärit suurima inokulaadi potentsiaaliga (vt statistiline andmete analüüs) õhkuivud juured. Juuri külmtöödeldi enne kasutamist krohmseente võimaliku puhkeperioodi läbimiseks +4 °C juures kuu aja vältel. Erinevate töötlustena kasutati 0,5 g, 1,0 g ja 1,3 grammi juuri kahe liitri 1/3 mahusuhetega substraadi kohta.

- Tšehhi päritolu Toode 1. Toode sisaldab etiketi järgi 6 liiki krohmseeni, kuid tootja ise kinnitas järelepärimisel vaid 4 liigi olemasolu (*Rhizoglo-*

intraradices, *Glomus mosseae*, *Claroideoglo-*
roideum, *C. etunicatum*). Levisteks on tootes nii juuretüki kui ka eosed. Eoste ekstraheerimisel õnnestus tootest eraldada 8 eost 50 cm³ toote kohta. Juuretüki olid paraku värvimiseks liialt väikesed ja peened, mistõttu polnud nende mükoriisuse taset võimalik välja selgitada. Lisaks krohmseente levistele sisaldab toode veel humaaate, peenestatud mineraale, mereorganismide ekstrakte ja biolagunevat vett-siduvat geeli. Kvaliteedikontrolli viiakse tootja kinnitusele läbi MPN (most probable number) (Adelman, Morton 1986) meetodil. Leviste arvu pole tootel tähistatud. Erinevate töötlustena kasutati pool- ja täisannust – vastavalt 10 ja 20 grammi 2 liitri kasvsubstraadi kohta. Annuste arvutamisel lähtuti tootjapoolsetest juhistest.

- Suurbritannia päritolu Toode 2 (75 g) sisaldab etiketi järgi kaheksa liiki krohmseeni ja seitse liiki ektomükoriisat moodustavaid seeni (krohmseened: *G. clarum*, *R. intraradices*, *G. mosseae*, *G. deserticola*, *G. monosporus*, *G. brasilianum*, *G. aggregatum*, *Gigaspora margarita*; ektomükoriisat moodustavad seened: *Rhizopogon amylopogon*, *R. fulvigleba*, *R. rubescens*, *R. villosuli*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma sp*). Lisaks sellele märgiti koostises veel liigilise täpsustusega teisi seeni, mullabaktereid, tseoliiti ja jälgelemente. Eoste ekstraheerimisel ei õnnestunud eraldada tootest ühtegi eost. Kuna toode oli väga peeneks jahvatatud, siis ei olnud võimalik ka juuri eraldada ega värvida. Vestluses ettevõtte esindajatega ei selgunud kvaliteedikontrolli olemasolu ja meetoodika. Leviste kogust tootes ei olnud välja toodud. Erinevate töötlustena kasutati pool- ja täisannust – vastavalt 3,75 ja 7,5 grammi kahe liitri kasvsubstraadi kohta. Annuste arvutamisel lähtuti tootjapoolsetest juhistest.

Kõik inokulaadid külvati pottidesse ühtlase kihina 3 cm sügavusele ning kaeti substraadiga. Katsesse lisati ka kontrollpotid, mida ei inokuleeritud. Pärast idanenud seemnete istutamist lülitati sisse valgustus. Taimi kasteti vastavalt vajadusele, enamasti iga nelja päeva järel. Kasvuperioodiks seatud kuue nädala möödudes kustutati valgustus ning lõpetati kastmine. Taimed lõigati mulla pinna lähedalt ning pakendati kilekottidesse maapealse biomassi määramiseks. Pottidest koguti juureproovid, mis värviti samal päeval ning neist määrati kolonisatsiooni aste.

Maisjuurte värvimine ja kolonisatsiooni määramine

Selleks, et määrata protsentuaalne juurte mükoriisise kolonisatsiooni aste oli vaja need eelnevalt selgitada ja värvida. Selleks kasutati Koske ja Gemma (1989) protokoll. Kolonisatsiooni aste määrati mikroskoobil 400× suurendusega. Kvalitatiivselt hinnati sajas mikroskoobi vaateväljas niitristiga lõikuvate krohmseente struktuuride olemasolu juurtes. Märgiti ära ka esinev struktuur: hüüfid, arbuskulid või vesikulid (joonis 1). Esineda võis ka mitu struktuuri korraga, mis sel juhul ka üles märgiti. Kuna loeti sada vaatevälja, oli võimalik jah/ei tulemuste põhjal määrata protsentuaalse kolonisatsiooni aste tervikuna ning erinevate esinenud struktuuride kaupa (McGonigle jt, 1990).



Joonis 1. Erinevad krohmseene struktuurid selgitatud ja trüpaansinisega värvitud maisjuurtes. Vasakult paremale: krohmseene hüüfi taimejuurde tungimise paik ehk apressorium; krohmseente hüüfid ja vesiikulid; harunenud puutaoline hüüfistruktuur toiteainete ülekandeks ehk arbuskul. (Autori fotod)

Figure 1. Different arbuscular mycorrhizal structures in cleared and stained maize roots. From left to right: the place where arbuscular mycorrhizal fungal hyphae intrude the plant root, known as an apressorium; hyphae and vesicles, heavily branched hyphal structure where Exchange of nutrients takes place, known as an arbuscule. (Photos by author)

Laboratoorsed analüüsid

Mikroskopeerimisel saadud tulemuste tõlgendamiseks tehti paljunduskatse pottide mullast pärast kasvatamist ka erinevad keemilised analüüsid. Valitud analüüsideks olid pH, toiteainete N (üld), P ja K (kättesaadav) ning orgaanilise süsiniku sisaldus. Analüüsid teostati Eesti Põllumajandusuuringute Keskuse agrokeemia laboratooriumis (akrediteeritud EVS-EN ISO/IEC 17025 standardile). Mulla pH määrati 1M KCl lahusest mahusuhtes 1/5 (ISO 10390, 2005). pH määrati lahuste valmistamisele järgnenud päeval *Automated pH GILKnick 100* pH-meetri abil. Mulla kogulämmastiku sisaldus määrati Kjeldahli meetodil (ISO 11261, 1995). Analüüs viidi läbi *Foss 2300 Kjeltex Analyser Unit* automaat-destillatsiooniseadmel. Mulla fosfori ja kaaliumisisaldus määrati Mehlich-3 väljatõmbelahusest seadmel *iCAP 6000 ICP-OES Thermo Scientific* (Ziadi, Sen Tran, 1993). Mulla orgaanilise süsiniku sisaldus määrati sulfokroom-oksüdatsiooni meetodil (ISO 14235, 1998).

Statistiline andmete analüüs

Paljunduskatses võrreldi erinevaid töötusi omavahel läbi keskmiste kolonisatsioonide, arvestades ka erinevate seenstruktuuride esinemist. Kuna vesiikulite esinemist ja kogukolonisatsiooni peeti edasise inokulatsiooni eesmärki silmas pidades olulisemaks muudest struktuuridest (Bierman, Linderman, 1983), väljendati saadud juurte inokulaadi potentsiaal väärtusena maksimaalsest võimalikust vesiikulite esinemisest ja kolonisatsioonist ehk

$$IP = \frac{V+K}{200},$$

kus IP – inokulaadi potentsiaal; V – vesiikulite esinemine protsentides; K – kogukolonisatsioon protsentides, järgi. Loodud indeksi väärtus 1 tähistab absoluutset kolonisatsiooni ja vesiikulite esinemist kogu juure

ulatuses, väärtus 0 tähistab kolonisatsiooni ja vesiikulite puudumist. Leidmaks olulisi seoseid erinevate mullaparameetrite, taimede biomassi ja krohmseente esinemise vahel, kasutati Pearsoni korrelatsiooni olulisusnivooga 0,05.

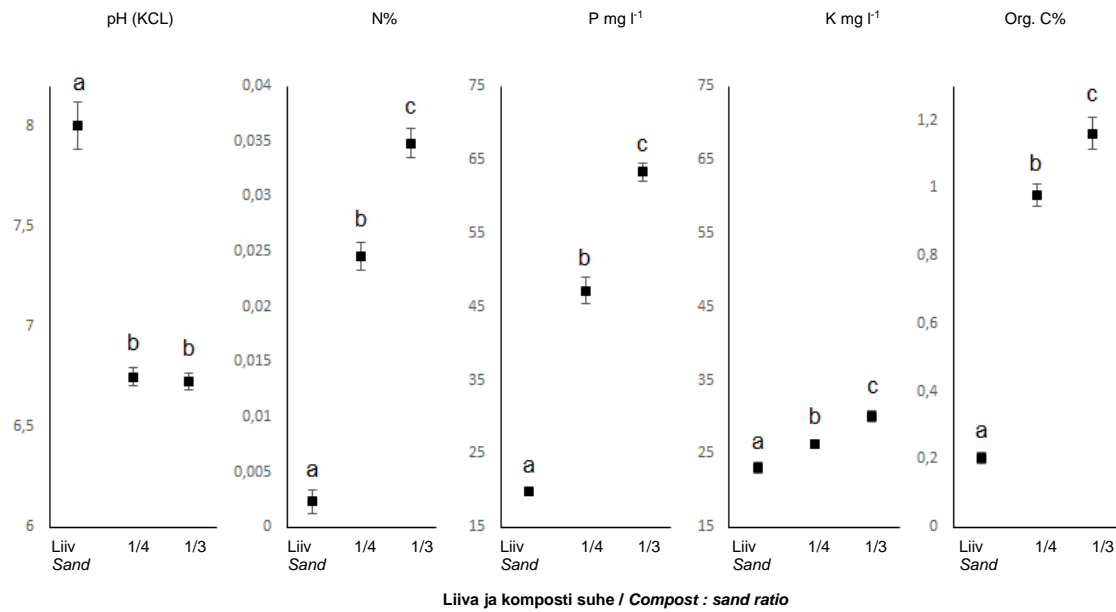
Tulemused

Paljunduskatse tulemused

Mulla keemilised analüüsid (joonis 2) kinnitasid ootuspäraselt olulisemate toiteainete sisalduse seotust orgaanilise süsiniku kogusega, mis omakorda peegeldab lisatud kasvumulla kogust. Mulla pH oli 1/3 ja 1/4 kompost/liiv mahusuhtega pottides neutraalse lähedane (6,7–6,9). Erandiks olid puhta liivaga potid, mille pH oli keskmiselt 8,2. pH korreleerus negatiivselt ($r = -0,92$) orgaanilise aine sisaldusega, viidates komposti ja liiva suhte peamisele rollile pH kujunemisel.

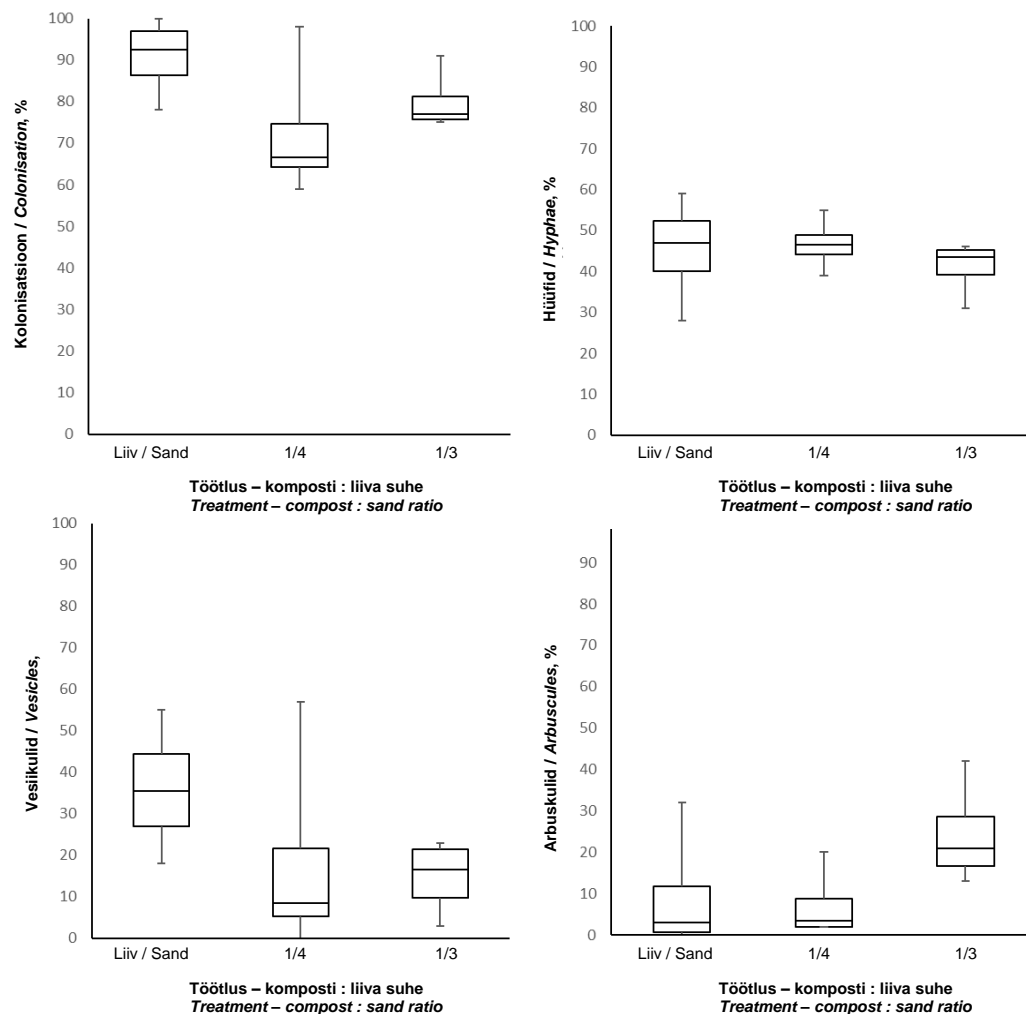
12 nädalase kasvuperioodi lõpul mullast eoseid ei leitud, mistõttu ei saanud neid ka kvantifitseerida ning kasutada sisendina tulemuste tõlgendamisel. Samas esines ulatuslik juurte kolonisatsioon krohmseentega, mis võimaldas katsetega jätkata (joonis 3).

Juurte kogu kolonisatsioon oli erinevates substraatides keskmiste väärtustena 72–91%. Kõige kõrgem keskmine kolonisatsioon oli puhtal liival kasvanud taimejuurtes, kuid statistiliselt olulisi erinevusi teiste töötlustega ei esinenud. Keskmine kolonisatsioon korreleerus negatiivselt substraadi lämmastiku ja fosforisisaldusega (r vastavalt $-0,76$ ja $-0,72$). Samuti esines positiivne korrelatsioon substraadi pH ja kogukolonisatsiooni vahel ($r = 0,91$). Arbuskulite esinemine oli positiivses korrelatsioonis substraadi peamiste toiteelementide (N: $r = 0,730$; P: $r = 0,746$; K: $r = 0,903$) ja orgaanilise süsiniku sisaldusega (joonis 4).



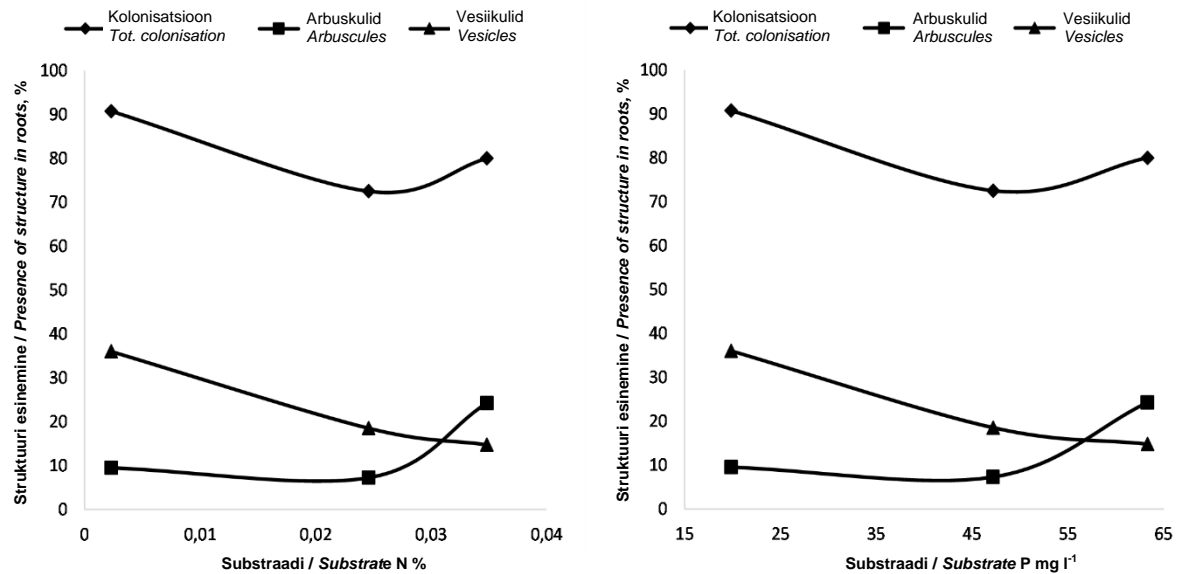
Joonis 2. Pajunduskatse substraatide lämmastiku, fosfori, kaaliumi ja orgaanilise süsiniku keskmised sisaldused ±SEM. Erinevate tähtedega on tähistatud statistiliselt oluliselt erinevad tulemused ($p < 0,05$)

Figure 2. Average nitrogen, phosphorous, potassium and organic carbon content of the substrates used in production experiment ±SEM. With different letters, statistically significant differences are shown



Joonis 3. Pajunduskatse taimede kogukolonisatsioon, arbuskulite, vesiikulite ja hüüfide esinemine maisijuurtes. Keskjoon tähistab mediaani, karbi piirid 25% ja 75% kvartiile, vurrud tulemuste amplituudi

Figure 3. Total colonisation, content of arbuscules, vesicles and hyphae in maize roots in production experiment. Whiskers indicate amplitude, box halves 25% and 75% quartiles, center line the median value

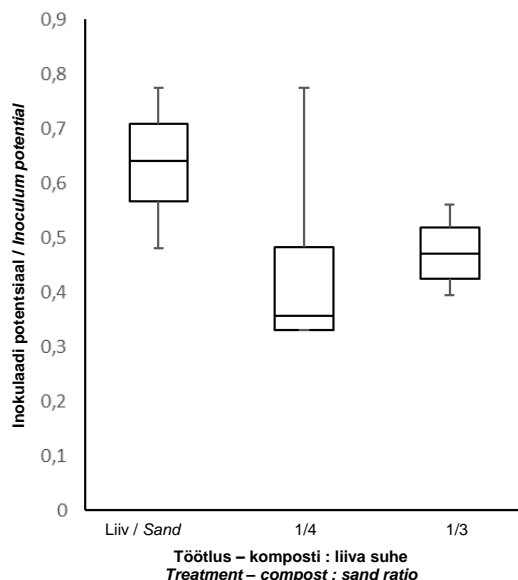


Joonis 4. Maisjuurtes esinevate kroomseene struktuuride sageduse seos substraadi kogulämmastiku ja kättesaadava fosfori sisaldusega paljunduskatses

Figure 4. Total colonisation, content of arbuscules, vesicles and hyphae in maize roots from production experiment

Hüüfide esinemises oli protsentuaalselt suurim osakaal 1/4 substraadiga pottides, kus see oli 47%, kuid ainult hüüfidega koloniseeritud juuri oli kõikides pottides siiski sarnasel määral. Vesiikulite esinemine oli hinnatud struktuuridest kõige varieeruvam. Keskmine vesiikulite sisaldus oli suurim liivaga pottides, kuid see ei erine statistiliselt oluliselt 1/4 substraadiga pottidest.

Vesiikulite sisaldus korreleerus siiski negatiivselt peamiste toiteelementide (N: $r = -0,980$; P: $r = -0,970$; K: $r = -0,744$) ja orgaanilise süsiniku ($r = -0,988$) sisaldusega substraadis. Inokulaadi potentsiaali indeks, mille kujunemisel mängivad suuremat rolli inokulandina paremate omadustega vesiikulid, oli keskmiselt suurim liivaga täidetud pottides (joonis 5). Antud katsetes valiti sellest tulenevalt edukaimaks paljundajaks liival kasvanud taimed ning nende juuri kasutati ka edasistes eksperimentides.



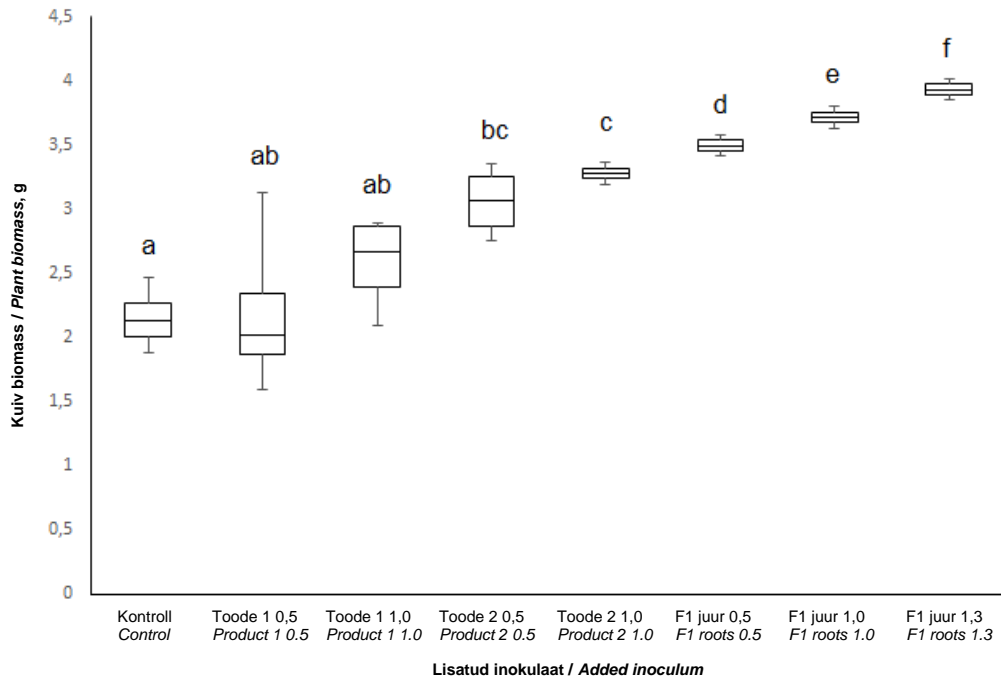
Joonis 5. Kogukolonisatsiooni ja vesiikulite sisaldust arvestav inokulaadi potentsiaali indeks paljunduskatses. Keskjoon tähistab mediaani, karbi piirid 25% ja 75% kvartiile, vurrud amplituudi

Figure 5. Inoculant potential indexes of production experiment, which takes into consideration total colonisation and vesicle content of roots. Whiskers indicate amplitude, box halves 25% and 75% quartiles, center line the median value

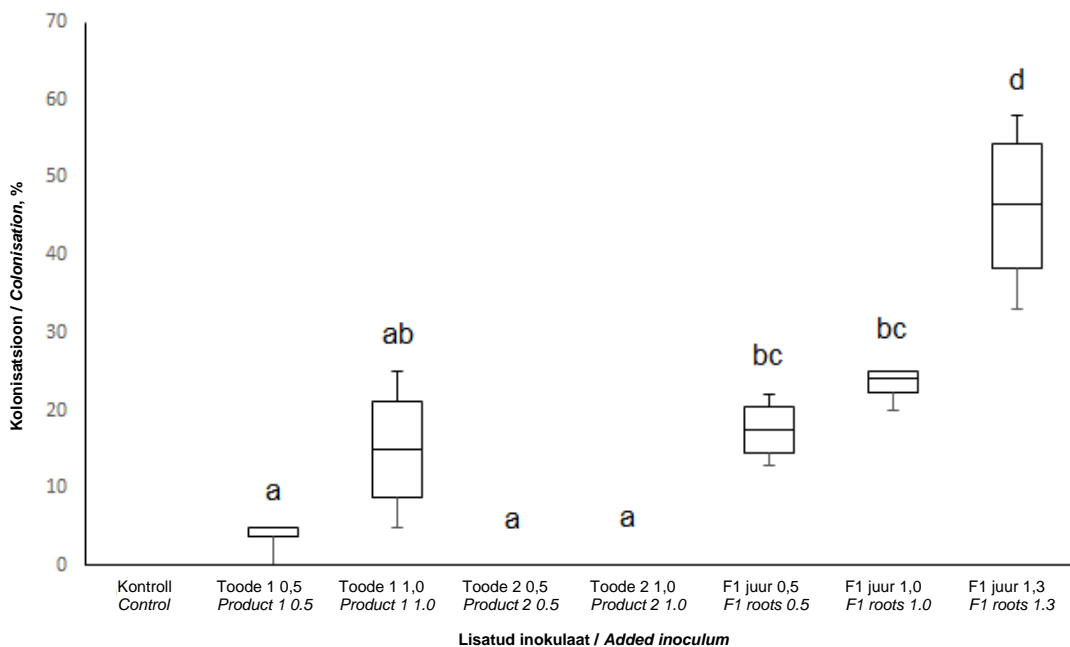
Võrdluskatse tulemused

Võrdluskatse tulemusena tuvastati mitmeid erinevusi kasutatud inokulaatide ning taimede biomassi ja juurte kolonisatsiooni vahel. Suurima kuivaine biomassiga, olid 1,3 grammi paljunduskatse juurtega inokuleeritud pottide maisitaimed, mis edestasid kontrollpotte koguni 45 protsendiga (joonis 6). Ka teised paljunduskatse juurtega inokuleeritud pottide maisitaimed olid ülejäänutest suurema biomassiga, kuid 0,5 või 1,3 grammi juurte kasutamise vahe oli taimede biomassis küllalt väike. Edukuselt järgmised olid Tootega 2 inokuleeritud potid, mille täisannusega töötuse biomass ületas kontrollpotte keskmiselt 34% võrra, kuid jäi parimale juuretöötusele siiski ligikaudu 17% võrra alla. Kasutatud inokulaatidest andis kõige kehva kasvuvastuse Toode 1, kuid millega töödeldud taimede biomass ületas siiski täisannuse puhul kontrolltöötlust veel 20 protsendi võrra.

Juurte kogukolonisatsiooni määramise tulemusel (joonis 7) kontrollpottides kroomseeni ei esinenud. Suurimat kolonisatsiooni näitas paljunduskatse juuretöötus 1,3 g juurtega ning seal ulatus kolonisatsioon keskmiselt 49%-ni. Teistel doosidel olid kolonisatsiooni väärtused oluliselt madalamad, jäädes 20% piirimaile.



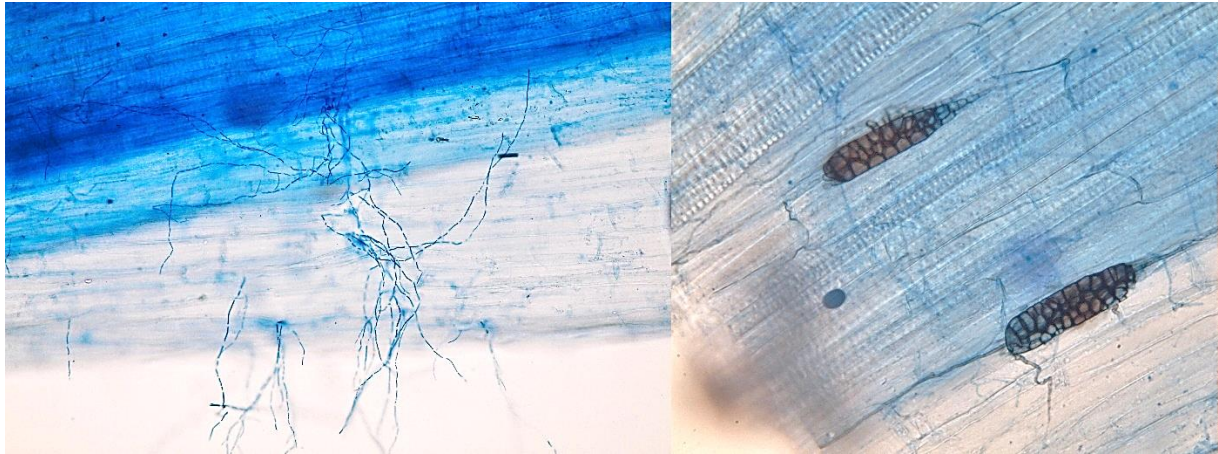
Joonis 6. Võrdluskatse taimede maapealne kuiv biomass vastavalt lisatud inokulaadile. Keskjoon tähistab mediaani, karbi piirid 25% ja 75% kvartiile, vurrud tulemuste amplituudi. Erinevate tähtedega on tähistatud statistiliselt olulised erinevused ($p < 0,05$)
Figure 6. Dry biomass of plants from the comparison test according to added inoculant. Whiskers indicate amplitude, box halves 25% and 75% quartiles, center line the median value. With different letters, statistically significant differences are shown ($p < 0,05$)



Joonis 7. Võrdluskatse taimede juurte kolonisatsioon erinevate inokulaatide kasutamise järgselt. Keskjoon tähistab mediaani, karbi piirid 25% ja 75% kvartiile, vurrud tulemuste amplituudi. Erinevate tähtedega on tähistatud statistiliselt olulised erinevused ($p < 0,05$)
Figure 7. Root colonisation with arbuscular mycorrhizal fungi from comparative experiment. Whiskers indicate amplitude, box halves 25% and 75% quartiles, center line the median value. With different letters, statistically significant differences are shown ($p < 0,05$)

Ka Toode 1 töödeldud pottide keskmine kolonisatsioon oli suhteliselt madal, jäädes täisannuse puhul 16% ja poolannuse puhul 4% lähedale. Täielikult puudusid krohmseened Toode 2 töödeldud pottides, kuid seevastu esines ulatuslik kolonisatsioon teiste seen-organismidega (joonis 8). Kuigi juuresiseste struktuuride põhjal on nende visuaalne määramine

äärmiselt keeruline või isegi võimatu, sarnanevad mitmed neist nn *Dark Septate Endophyte* (DSE) rühma kuuluvate seentega, kelle seas samuti mutualistlikku eluviisi on täheldatud. Lisaks esineb hüüfistruktuure, mida võib kohata *Trichoderma* seeneperekonnas, kelle olemasolu tootjad ka personaalses kirjavahetuses tunnistasid.



Joonis 8. Juurekolonisatsioon arbuskulaarset mükoriisat mittemoodustavate seentega (Autori fotod)
Figure 8. Root colonisation with non-arbuscular mycorrhizal fungi (Photos by author)

Arutelu

Paljunduskatse

Mulla tähtsamate taimetoiteainete võrdluses mikroskoopiliselt määratud krohmseente juurekolonisatsiooniga paistab silma nende omavaheline negatiivne suhe. See järgib üldist taimede mükoriisise toitumise alustõde, kus toiteainete kättesaadavuse suurenedes väheneb taimedepoolne panus mükoriisasse – mida rohkem on toiteaineid võimalik kätte saada juurtoitumise teel, seda vähem on põhjust üleval pidada küllaltki kulukat seenpartnerit (van der Heijden jt, 2015). Toiteainete sisalduse vähenedes suureneb panus ka mükoriisasse, kuna valgusenergia asemel saab taimekasvu piiravaks teguriks toiteainete kättesaadavus (Koorem jt, 2014). Seega on taime seisukohast ökonoomsem investeerida laiemalt kättesaadavaid valgusenergiaga toodetavaidprodukte läbi mükoriisa toiteainete omastamisse. Kuigi mulla happesuse ja krohmseente kolonisatsiooni vahel esines tugev korrelatsioon, on kõikumine substraatide pH-s siiski küllalt marginaalne, teatud erinevusega liivaga täidetud pottides. Ehkki mullaseente arvukus on mulla happesusega tugevalt seotud (Rousk jt, 2010), ei ole käesolevas uuringus võimalik selle mõjusid orgaanilise aine omadest eristada.

Parimate inokulaadi omadustega töötlus selgitati välja kasutades inokulaadi potentsiaali indeksit. Läbi viidud katses see end õigustas ning vääriski ka edaspidist kasutamist juhul, kui tegemist on juurteil põhineva inokulaadiga. Inokulaadi potentsiaali indeks eelistab vesiikuleid arbuskulite ees, kuna need on edasist inokulatsiooni silmas pidades paremini säilivad ning suurema regeneratsioonivõimega (Bellgard, 1992).

Asjaolu, et 12 nädalase kasvuperioodi lõpuks ei olnud veel seened jõudnud sporuleerumiseni võib tõenäoliselt seletada liialt lühikese kasvuperioodiga (Oehl jt, 2009). Võib arvata, et seened olid katse lõpetamisel veel aktiivses ainevahetuslikus eluperioodis kuna lõppenud ei olnud ka taimede kasv. Kuna ka ainult juuri inokulaadina kasutades saadi head tulemused, on lühem kasvuperiood aja kokkuhoiu huvides siiski arvestatav alternatiiv terve vegetatsiooniperioodi vältava paljunduse asemel.

Võrdluskatse

Võrdluskatse tulemused näitavad, et iseseisvalt kasvatatud inokulaat ei jää oma omadustelt alla kaubanduslikele toodetele. Isekasvatatud inokulaadiga töödeldud pottide taimede biomass ja juurte kolonisatsioon olid kõrgemad kui kaubanduslike inokulaatidega töödeldud taimedel. Arvatavasti on eeliseks sel juhul eelkõige inokulaadi värskus, kuid nagu käesolevast uuringust välja tuleb, siis ka see, et inokulaat üldse krohmseeni sisaldab. Asjaolu, et Toode 2 kasutamine andis krohmseente puudumisel arvestatava kasvuvastuse, mis kajastus ka maisitaimede biomassis, võib hüpoteetiliselt seletada teiste mutualistlike seente esinemisega. Võib oletada, et need seened andsid taimedele kasvueelise, ent kuna katse disain neid eraldi ei käsitletud, ei ole ka nende mõju võimalik täpselt hinnata. Laiemas perspektiivis viitab see mulla mikroorganismide sünergistilisele mõjule ka väljaspool krohmseente hõimkonda, millele oleks samuti mõistlik tulevikus tähelepanu pöörata.

Lihtsa inokulaadi tootmise võimalustest

Krohmseente inokulaatide kasvatamine potikultuuris ei ole sugugi uus meetod ning seda on kasutatud aastakümnete vältel suures hulgas teadusuuringutes nii otsese katseplatvormina kui ka inokulaadi tootmiseks (Berruti jt, 2015). Sagenenud on ka viited potikultuuride kasutamise kohta majanduslikul eesmärgil, kus sarnastes süsteemides toodetakse inokulaati näiteks köögiviljakasvatuseks (nt Doude jt, 2005). Potikultuuridel on oma lihtsuses mitmeid eeliseid muudel meetoditel kasvatatud inokulaatide ees. Potikultuuride ülesseadmiseks ei ole vaja spetsiaalseid tingimusi ning laboratoorset baasi, samuti on kulumaterjalid lihtsasti kättesaadavad ning potikultuuride alustamine ei nõua spetsiifilist väljaõpet.

Uuringu katsetulemustele toetudes tuleks kasutatav kasvustraat hoida võimalikult toiteainevaene, kuid siiski piisav katsetaime elutsükli läbimiseks. Katsetaimena on kasutatud paljusid erinevaid liike, kuid valiku eelduseks on mükoriisse toitumise esinemine, suhteliselt kiire ja tugev kasv, sobivus kasvutingimustega ning kättesaadavus. Maailmas kasutatakse palju C4 tüüpi taimi, millel on kiire elutsükkel ning mis hukkuvad esimeste külmadega – näiteks mais, erinevad sorgoliigid (*Sorghum sp*) ja bahiarohi (*Paspalum notatum*). Eestis võib nende kättesaadavus olla aga piiratud, mistõttu võib alternatiivina kasutada näiteks sibulat (*Allium cepa*) või teelehti (*Plantago sp*). Potikultuuri ülesseadmiseks võib kindlasti kasutada ka teisi taimi, kuid siis tuleks kontrollida, kas valitud taim on mükoriisne (nt MycoFlor andmebaasist <http://www.esapubs.org/archive/ecol/E094/123/> Hempel jt, 2013). Potikultuurides võib kasutada ka taimi millel hiljem inokulaati plaanis tarvitata. Vegetatsiooni- ja elutsükli läbinud potikultuurid võiks jätta üle talve õue, läbimaks mõnele krohmseene liikidele vajalikku puhkeperioodi. Inokulaadina sobivad kasutamiseks nii taimede juured kui ka kasvustraat (Klironomos, Hart, 2002) – viimane eeldusel, et kasvuperiood on piisavalt pikk seente elutsükli läbimiseks ja sporulatsiooniks.

Potikultuurides krohmseente paljundamisel on siiski ka omad puudujäägid. Taimed vajavad kasvuperioodil teataval hulgal hoolt ning järelvalvet. Potikultuurid sõltuvad paratamatult saada olevast valgusest õues või kasvuhoones, kus nad võivad ka arvestataval määral ruumi hõivata. Kuna kasvusüsteem ei ole iseenesest steriilne, on oht inokulaadiga süsteemi tuua ka taimekahjustajaid või umbrohuseemneid.

Krohmseened kaubanduses

Eestis on krohmseeni sisaldavate inokulaatide valik veel väike ning ühtki toodet, mille esmaotstarve oleks krohmseente arvukuse suurendamine turul ei ole. Imporditakse vaid tooteid, mille koostises on välja toodud lisandina ka krohmseente levised (korrespondents Põllumajandusametiga 2017. a). Välisriikidest leiame nii Euroopast kui ka kaugemalt suurel hulgal erinevaid krohmseeni sisaldavaid inokulaate ja nende tootjaid. Euroopas on tooted turustatud peamiselt

väiksematele aiasaaduste kasvatajatele. Toodete liigiline koostis varieerub ühest-kahest liigist kümnete liikideni. Leviste sisaldust ei ole sageli välja toodud või on see kujutatud kõikide liikide leviste üldarvuna, ulatudes sadade tuhandeteni grammi kohta. Lähemal uurimisel selgub tihti, et krohmseente leviste arvukus ei ületa enamasti kümnet osakest grammi kohta. Suur osakeste arv saavutatakse saprotroofsete ehk lagundavate seente leviste lisamisega tootesse. Seetõttu võib esmapilgul paista, et tegemist on äärmiselt kontsentreeritud toodetega, mida nad krohmseente poolest tegelikkuses ei ole. Tõsiasi on, et regulatsioon või tööstuse standard krohmseente kui küllalt uute taimekasvatustehnikate preparaatide puhul veel puudub. Samuti puuduvad instantsid, kes oleksid võimelised või motiveeritud neid kontrollima. Tekkinud olukord on veelgi kohatum, arvestades, et näiteks väetised ja taimekaitsevahendid (taimekaitse omadusi tuuakse krohmseente puhul sageli välja) peavad läbima põhjaliku analüüsi akrediteeritud laboratooriumides.

Regulatsioonide puudumine krohmseente tootmise, turustamise ja sildistamise osas on kaasa toonud suure varieeruvuse toodete kvaliteedis. Ka käesolevas uuringus katsetatud kaubanduslike inokulaatide puhul oli näha lubatud ja tegeliku koostise ning efektiivsuse lahknevusi. Nii ei sisaldanud üks kasutatud toodetest üldse krohmseeni ning teises oli leviste arvukus madalam kui looduslikus mullas. Samas võib Toode 2 näitel tekkida võimalus, et lisaks krohmseentele sisaldavad inokulaadid ka teisi organisme kes võivad olla juhtumisi kahjutud või mutualistlikud (Mandyam, Jumpponen, 2014), aga võivad olla ka kahjulikud.

Kuna mikroorganismide kasutamine on ka mahepõllumajanduse määruse kohaselt lubatud ja nende tootmine ei ole reguleeritud, siis selliste toodete kasutamisele ja turustamisele Euroopa Liidus piiranguid ei seata, välja arvatud juhul kui mükoriisaseened on toodetud geneetiliselt muundatud organismidest (GMO), sest GMOde kasutamine ei ole mahepõllumajanduses lubatud (RT I 2004, 6, 31). Inokulaatide kasutamise seadusele vastavus mahepõllumajanduses sõltub seega toote lisandite päritolust ja olemusest, teoreetiliselt ka seente paljundusmeetodikast, lõpuks aga paraku siiski sellest, mis tootja on pakendile kirjutanud.

Perspektiivid

Kaasajal lisandub teaduskirjandusse pidevalt uusi artikleid krohmseente kasutamise kohta. Kui seni on see informatsioon jäänud kitsa ringi teadlaste huviorbiiti, siis nüüdseks on huvi krohmseente vastu tärnandunud ka põllumeeste ja muude huvigruppide seas. Eriti võiksid uutest võimalustest puudust tunda maheviljelejad, kel tavatootjatega võrreldes on saagikuse tõstmiseks kasutada väga piiratud hulgal kalleid vahendeid. Seejuures on aga puudulik asjakohase juhendmaterjali olemasolu. Kuna teadusartiklid ei ole enamasti lihtsasti loetavad ning veel vähem kättesaadavad, saadakse teadmised populaarteaduslikest või sisuturundusele suunatud kirjutistest. Eksitava informatsiooni

leviku ohjeldamiseks lasub seega arusaadavas keeles info- ja juhendamise kirjutamise vastutus teadlaskonnal, kes seni on sellega vähem tegeleenud kui võiks. Eestis on selles osas paras aeg tegutsemiseks, kuna maailmas levima hakanud krohmseentega inokuleerimise populaarsus ei ole veel päriselt kohale jõudnud, nagu ka sellega kaasas käiv informatsioonilaine. Arvestades üldisi trende, siis see aga kindlasti juhtub ning see, kas meie huvigrupid on varustatud objektiivse informatsiooniga inokulatsiooni põhimõtetest, vajaduspõhisest, meetodikast ja alternatiividest, võib saada määravaks nagu valdkonna edasises arengus.

Järeldused

Krohmseente paljundamise katses olid maisijuured tugevalt koloniseeritud ning sobisid kasutamiseks inokulaadina. Paljundamiseks sobivaim kasvusubstraat oli inokulandi potentsiaali indeksi põhjal puhas liiv, millele lisatud 5% looduslikku mulda. Võrdluskatses selgus, et kõige efektiivsemaks inokulaadiks olid paljunduskatse maisijuured, mille mõjul suurenes maisitaimede maapealne biomass kuuendaks nädalaks 45% võrreldes inokuleerimata taimedega. Ka kaubanduslike inokulaatidega saavutati suurem maisitaimede biomass, kuid nende efektiivsus oli oluliselt madalam. Katse tulemused väljendasid puudujääke kaubanduslike toodete kvaliteedis, mille üheks põhjuseks võib olla ebapiisav kvaliteedikontroll ning puuduvad regulatsioonid ja standardid. Võib arvata, et lihtsasti toodetavatel krohmseene-inokulaatidel on potentsiaali jõuda suurema hulga kasutajateni ning nendega saavutatavad tulemused on vähemasti sama head, kui kaubanduslike toodete puhul.

Tänuavaldused

Käesolevat uuringut on rahastanud Põllumajandus-uuringute Keskus, Tallinna Ülikooli Uuringufond ja Tallinna Ülikooli Loodus- ja Terviseteaduste Instituut.

Huvide konflikt / Conflict of interests

Autoritel puudub huvide konflikt kõikide osapooltega. *The author declares that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.*

Autorite panus / Author contributions

Katse korraldamine, proovide kogumine ja analüüs, käsikirja kirjutamine, toimetamine: TV.
Katse korraldamine, käsikirja toimetamine: MN.
Experiment design, sample collection and analysis, writing of manuscript, editing of manuscript: TV.
Experiment design, editing of manuscript: MN.

Kasutatud kirjandus

Adelman, M.J., Morton, J.B. 1986. Infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: Influence of host-soil diluent combinations on MPN estimates and

percentage colonization. – *Soil Biology and Biochemistry*, 18:7–13.

Bellgard, S.E. 1992. The propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi capable of initiating VAM infection after topsoil disturbance. – *Mycorrhiza*, 1:147–152.

Bender, F.S., Wagg, C., van der Heijden, M.G.A. 2016. An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. – *Trends in Ecology & Evolution*, 31:440–452.

Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., Bianciotto, V. 2015. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. – *Frontiers in Microbiology*, 6:1559.

Bierman, B., Linderman, R.G. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. – *New Phytologist*, 95:97–105.

Bierman, B., Linderman, R.G. 1981. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. – *New Phytologist*, 59:171–180.

Brennan, A., Fortuneb, T., Bolger, T. 2006. Collembola abundances and assemblage structures in conventionally tilled and conservation tillage arable systems. – *Pedobiologia*, 50:135–145

Douds, D.D., Nagahashi, G., Pfeffer, P.E., Kayser, W.M., Reider, C. 2005. On-farm production and utilization of mycorrhizal fungus inoculum. – *Canadian Journal of Plant Science*, 85:15–21.

Eddy, R., Hahn, D. T. 2010. Optimizing Greenhouse Corn Production: What Is the Best Lighting and Plant Density? – *Purdue Methods for Corn Growth*, 13.

Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M. *et al.* 2011. Solutions for a cultivated planet. – *Nature*, 478:337–342.

Furlan V., Bartschii H., Fortin J.A. 1980. Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. – *Transactions of the British Mycological Society*, 75:336–338.

Garnett, T., Appleby, M. C., Balmford, A., Bateman, I. J., Benton, T. G., Bloomer, P. *et al.* 2013. Sustainable intensification in agriculture: premises and policies. – *Science*, 341:33–34.

Gerz, M., Bueno, C.G., Zobel, M., Moora, M. 2015. Plant community mycorrhization in temperate forests and grasslands: relations with edaphic properties and plant diversity. – *Journal of Vegetation Science*, 27:89–99.

Hempel, S., Götzenberger, L., Kühn, I., Michalski, S.G., Rillig, M.C., Zobel, M., Moora, M. 2013. Mycorrhizas in the Central European flora: relationships with plant life history traits and ecology. – *Ecology*, 94:1389–1399.

ISO 10390 2005. Soil quality – Determination of pH. – www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=40879 (17.09.16)

ISO 11261 1995. Soil quality – Determination of total nitrogen – Modified Kjeldahl method. – www.iso.org

- org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=19239 (17.09.16)
- ISO 11464 2006. Soil quality – Pretreatment of samples for physico-chemical analyses. – www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=37718 (17.09.16)
- ISO 14235 1998. Soil quality – Determination of organic carbon by sulfochromic oxidation – www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=23140 (17.09.16)
- Klironomos, J.N., Hart, M.M. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. – *Mycorrhiza*, 12:181.
- Koorem, K., Gazol, A., Öpik, M., Moora, M., Saks, Ü., Uibopuu, A., Sõber, V., Zobel, M. 2014. Soil Nutrient Content Influences the Abundance of Soil Microbes but Not Plant Biomass at the Small-Scale. – *PLoS ONE*, 9 (3).
- Koske, R.E., Gemma, J.N. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. – *Mycological Research*, 92:486–505.
- Leifheit, E.F., Veresoglou, S.D., Lehmann, A., Morris, E.K., Rillig, M.C. 2014. Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation – a meta-analysis. – *Plant Soil*, 374:523–537.
- Mahepõllumajanduse seadus. 2004. Riigi Teataja I, 6, 31.
- Mandyam, K.G., Jumpponen, A. 2014. Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. – *Frontiers in Microbiology*, 5:776.
- McDaniel, M., Tiemann, L., Grandy, A. 2013. Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? a meta-analysis. – *Ecology Applied*, 24:560–570.
- 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*, 115:95–501.
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Wiemken, A., Boller, T. 2009. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. – *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 134:57–268.
- Paal, J. 1999. Eesti Taimkatte Kasvukohatüüpide Klassifikatsioon. – Tartu.
- Read, D.J., Koucheki, H.K., Hodgson, J. 1976. Vesicular-arbuscular mycorrhizas in natural vegetation systems. – *New Phytologist*, 77:641–653.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. – *The ISME Journal*, 4:1340–1351.
- Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S., Futai, K. 2008. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, Springer verlag.
- Smith, S.E., Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis* 2nd ed. – Academic Press, San Diego.
- Spatafora, J.W., Chang, Y., Benny, G.L., Lazarus, K., Smith, M.E., Berbee, M.L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T.Y., O'Donnell, K., Roberson, R.W., Taylor, T.N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M.M., Stajich, J.E. 2016. A Phylum-Level Phylogenetic Classification of Zygomycete Fungi Based on Genome-Scale Data. – *Mycologia*, 108:1028–1046.
- Ziadi, N., Sen Tran, T. 1993. Mehlich-3 extractable elements. In: *Soil Sampling and Methods of Analysis* (Eds. M.R. Carter, E.G. Gregorich). – CRC Press, Boca Raton.
- van der Heijden, M.G.A., Martin, F.M., Selosse, M.-A., Sanders, I.R., 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past the present, and the future. – *New Phytologist*, 205:1406–1423.
- Verbruggen, E., Rölting, W.F.M., Gamper, H., Kowalchuk, G., Verhoef, H., van der Heijden, M.G.A. 2010. Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: of mycorrhizal fungal comparison in agricultural communities soils. – *New Phytologist*, 186:968–979.
- Vosatka, M., Latr, A., Gianinazzi, S., Albrechtova, J. 2012. Development of arbuscular mycorrhizal biotechnology and industry: current achievements and bottlenecks. – *Symbiosis* 58:29–37.
- Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F., van der Heijden, M.G.A. 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. – *Proceedings of the National Academy of Science of U.S.A.* 111:5266–5270.
- 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.

Comparing a simple arbuscular mycorrhizal fungal inoculum with commercial products for enhancing plant growth

Tanel Vahter¹, Märt Nõges²

¹University of Tartu, Institute of Ecology and Earth Sciences, department of botany, Lai tn 40, 51008, Tartu, Estonia

²Estonian Agricultural Research Center, Teaduse 4/6, 75001, Saku, Estonia

Summary

Glomeromycota is a group of soil fungi that form arbuscular mycorrhizas. They are obligate symbionts, who form mutualistic relationships with most terrestrial plants. In an arbuscular mycorrhizal relationship, the plant supplies the fungal partner with all the necessary products of photosynthesis, while in return receiving various nutrients from the soil. With reduced mycorrhizal activity following anthropogenic disturbances, inoculation could be a useful means to restore the numbers and variety of these fungi and increase plant biomass. Thus far, because of its high cost and poor

availability, inoculation is yet to be used on a substantial scale. The aims of this study were in essence to optimise the methodology for inoculum production and therefore reduce costs and increase availability to the wider audience. The possibilities of trap-cultures to produce crude inocula were tested and the most suitable substrate mixture determined. The inoculum obtained was compared with commercial inoculants in potting experiments. The results of this study indicate that the best substrate media for multiplication of Glomeromycota fungi to produce crude inocula, is sand with only 100 ml of added natural alvar (Mollihumi-Rendzic Leptosol, WRB) soil. Root inocula obtained from

plants grown in this manner induced both higher biomass and root colonisation in test plants than the commercial inoculants. One of the used inoculants didn't contain any mycorrhizal fungi at all, stressing the need for quality control and industry standards. This study gives insights for the application of mycorrhizal fungi in a small-scale agricultural setting. The inoculation of bigger areas is still problematic but with methodological development, the field of mycorrhizal inoculations is highly promising in agricultural, horticultural and ecological restoration scenarios.