

Tartu Ülikool
Ökoloogia ja maateaduste instituut
Botaanika osakond

Greete Horn

**Arbuskulaarmükoriisete seente roll taimede ja mulla
vahelise tagasiside kujunemisel**

Magistritöö

Juhendajad: PhD Marina Semchenko
MSc Sirgi Saar

Tartu 2016

Arbuskulaarmükoriisete seente roll taimede ja mulla vahelise tagasiside kujunemisel

Lühikokkuvõte:

Käesoleva magistritöö raames uuriti arbuskulaarmükoriisete (AM) seente rolli taimede ja mulla vahelises tagasisides. Uurimistöö käigus viidi läbi kaheosaline taimede ja mulla vahelise tagasiside katse. Katse esimeses faasis uuriti taimeliikide sõltuvust mükoriisast. Katse teises faasis uuriti taimeliikide tagasisidet kasvatades taimi enda ja teiste taimeliikide mullal, koos AM seentega ja ilma. Katse tulemustest selgus, et erineva mükoriisusest sõltuvusega taimedel on erinev tagasiside reaktsioon AM seente olemasolu või puudumise korral.

Võtmesõnad:

Taim-muld tagasiside; mulla mikroobne tagasiside; arbuskulaarne mükoriisa

CERCS: B270

The role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant-soil feedback

Abstract:

The aim of the current study was to determine the role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in plant-soil feedback. To test this, the plant-soil feedback experiment was conducted, using 10 plant species. In the first part of experiment plant species mycorrhizal dependency was determined. In the second part, the plant-soil feedback effects on different plant species was researched. Plants were growing in their own soil or soil of other plant species, with or without AM fungi. The results show that the presence or absence of AM fungi has an effect on plant soil feedback.

Keywords:

Plant-soil feedback; soil microbial feedback; arbuscular mycorrhiza

CERCS: B270

Sisukord

1. Sissejuhatus	4
1.1 Taimekoosluste funktsioneerimine	4
1.2 Taime ja mulla vaheline tagasiside	5
1.3 Mullamikroobid	6
1.4 Mulla mikroobne tagasiside ja selle seos taime tunnustega	9
1.4.1 Taimeliigi ohtruse seos tagasisidega.....	9
1.4.2 Taimede invasiivsuse seos tagasisidega	10
1.4.3 Erinevate taime elukäigutunnuste seos tagasisidega.....	10
1.5 Mullamikroobide olulisus taimekoosluse funktsioneerimisel	11
1.6 Magistritöö eesmärgid	12
2. Materjal ja metoodika	13
2.1 Ülevaade katses kasutatud taimeliikidest	13
2.2 Potikatses ülesehitus	15
2.2.1 Katse I faas - mulla ettevalmistamine ja taimeliikide mükoriisne vastus	15
2.2.2 Katse II faas – mulla ja taimede vaheline tagasiside.....	16
2.3 Mõõtmised	17
2.3.1 Katse I faas	17
2.3.2 Katse II faas	18
2.4 Andmeanalüüs	18
2.4.1 Katse I faas	18
2.4.2 Katse II faas	19
3. Tulemused	20
3.1 Katse I faasi töötluste mõju taimeliikide biomassile.....	20
3.2 Katse I faasi töötluste mõju taimede AM kolonisatsioonile.....	22
3.4 Katses kasutatud liikide RMD	23
3.5 Katse II faasi töötluste mõju maapealsele biomassile	24
4. Arutelu.....	27
Kokkuvõte.....	31
Summary	32
Tänuõnad	34
Kasutatud kirjandus.....	35
LISAD.....	39

1. Sissejuhatus

1.1 Taimekoosluste funktsioneerimine

Taimekoosluste funktsioneerimise mõistmiseks on vajalik aru saada millised mehhanismid võimaldavad erinevatel taimeliikidel koos eksisteerida. Taimede kooseksisteerimist on defineeritud kui taimeliikide koos kasvamist ühes elupaigas, üksteist välja tõrjumata (Begon et al. 2005). Ühises elupaigas kasvavad taimed peavad omavahel jagama kasvusubstraati ja seega sealseid eluks olulisi ressursse. Muld aga on ajaliselt ning ruumiliselt heterogeenne keskkond. Mulla heterogeensust põhjustavad suur hulk erinevaid abiootilisi (vesi, toitained, temperatuur, pH) ja biootilisi faktoreid (mikroorganismid, taimed). Erinevate heterogeensust mõjutavate faktorite poolt tingitud mulla omadused mõjutavad omakorda nii mullal kasvavaid taimi, taimekoosluse struktuuri, kui ka koosluse dünaamikat (Bever et al. 1997; Buée et al. 2009). Liikide kooseksisteerimist on püütud selgitada nii taimedele oluliste ressursside jaotuse, samuti konkurentsi (Sih et al. 1985), aga ka levimisvõime kaudu (Niiyama 1990), kuid üksinda ei suuda need teooriad lõplikult erinevate taimeliikide ühises elupaigas kasvamist seletada. Üha enam on hakatud taimede kooseksisteerimise uurimisel lähtuma ideest, et taimed suudavad interakteeruda nii omavahel kui ka mullas elavate mikroorganismidega. Taimede ja mullaorganismide omavahelised suhted võivad mõjutada nii taime enda heaolu, kui ka erinevate liikide koos kasvamist ühises elupaigas (Klironomos 2002; van der Putten et al. 2013).

Taimeliikide konkurentsivõimet võib vaadelda kui käitumuslikku tunnust. Evolutsiooni käigus on liigid omandanud konkurentsiolukorras hakkama saamiseks erinevad strateegiad. Kõrget konkurentsivõimet omavad liigid käituvad konkurentsiolukorras agressiivselt, paigutades võimalikult palju energiat ressursside omastamisele, mis vastasel juhul omastataks konkurentide poolt. Agressiivne käitumine võib olla soositud olukorras, kus toimub konkureerimine mittedomineerivate liikidega (Lepik et al. 2012). Sellele vastanduv strateegia on olla koostööaldis ning käituda altruistlikult. Koostööaldis liigid on edukad, kasvades koos sama strateegiat kasutavate liikidega, kuid sattudes kõrvuti isekatega jäävad konkurentsisis alla. Tunnused, mis määravad liigi ruumilist paiknemist või agregeerumist, peaksid koevolutsioneeruma konkurentsivõimega (Semchenko et al. 2013). Liikide kooseksisteerimist on uuritud parasvöötme liigirikastel niidukooslustel, kus taimed on tihti klonaalse levikuga. Klonaalsete taimede rametid paiknevad teatud kindla vahemaa tagant ning see on

liigispetsiifiline omadus (Benot et al. 2013). Kui lähtuda taimedele omaste tunnuste koevolutsioneerumisest, oleks tugevatel konkurentidel parem levimisvõime ja ruumiliselt tihedamalt agregeerunud liikidel väiksem konkurentsivõime (Semchenko et al. 2013). Strateegiatel on omad eelised ning siinkohal võib nõrkade konkurentide eeliseks olla agregeerumine, mis lisaks füüsiliselt tihedalt koos kasvamisele, annab võimaluse liigile spetsiifiliste mikroobide akumulatsiooniks. Tihedamalt agregeerunud taimed ei pea oma energiat kulutama kaugemale levimisele, vaid suunavad selle mikroobidega koosseisestamiseks. Tugevamad konkurendid jäävad sellisel juhul ebasoodsasse olukorda ja neid päästab parem levimisvõime (Semchenko et al. 2013).

1.2 Taime ja mulla vaheline tagasiside

Taime ja mulla vaheline tagasiside koosneb kahest etapist. Esmalt mõjutab taim oma kohaloluga mulla mikrobikoosluse tihedust ja koosseisu ning seejärel reageerib järgmine taim mullas toimunud muutustele spetsiifilise vastusega, milleks on taime kasvu soodustamine või pärssimine. Taim võib potentsiaalselt muuta mulla füüsikalisi omadusi (mulla struktuur, veesisaldus, temperatuur), mõjutada keemilisi ja biokeemilisi komponente (allelokemikalid, mulla pH, orgaanilise aine sisaldus ja kvaliteet, toitained) ning ka bioloogilisi komponente (lagundajad, parasiidid, patogeenid, mutualistid). Selline taimede poolt tekitatud heterogeensus mulla omadustes võib mõjutada nii sama taimeisendit, naabruses kasvavaid liigikaaslasi, kui ka teist liiki naabertaimi (Bezemer et al. 2006; Miki 2012; Pregitzer et al. 2010; van der Putten et al. 2013). Tagasiside efekt taime ja mulla vahel võib varieeruda positiivsest negatiivseni ja võib põhjustada olulisi muutusi taime tunnustes, muuta taimeliikide kasvamist ja seeläbi ka taimekoosluse ülesehitust. Mulla ja taime vaheline tagasisideefekt võib olla positiivne juhul, kui taime enda ja tema järglaste elumus, ehk ellujäänud isendite suhteline hulk, sõltuvalt mullaomadustest suureneb. Taime kasvule mõjuvad positiivselt mullas elavate sümbiontide või mutualistide, nagu mükoriisat moodustavate seente ja lämmastikku fikseerivate bakterite suurenenud hulk, mis soodustavad taime toitainete kättesaadavust mullast (Bezemer et al. 2006; van der Putten et al. 2013; Pregitzer et al. 2010). Mulla ja taime vahelise negatiivse tagasiside korral on taime enda kasv mullal pärssitud. Negatiivset tagasisidet võivad põhjustada nii suurenenud patogeenide hulk (Klironomos 2002), teiste taimede juureeritised, kui ka vähenenud toitainete hulk mullas (van der Putten 2003).

1.3 Mullamikroobid

Muld kui mikroobide elukeskkond on ajaliselt ja ruumiliselt väga heterogeenne. Taime juurte vahetu lähedus ehk risosfäär eristub ülejäänud mullast paljude oluliste parameetrite poolest. Näiteks on risosfääris tänu taimedele suurenenud süsiniku hulk. Taimed eritavad juurte kaudu pea 20% fotosünteesil talletatud süsinikust, luues sellega juurestiku vahetusse lähedusse mikroobide jaoks soodsa elukeskkonna (Bever 2003; Buée et al. 2009; Zamioudis et al. 2013). Lisaks mõjutavad taimejuured tugevalt oma ümbrust juureeritistega (Broeckling et al. 2008), tekitades erinevate mikroobide eluks ökoloogiliselt sobivaid nišše. Kõik taime füsioloogiale, geneetilisele taustale, elukäigule ja ökoloogiale omaste parameetrite väärtused, samuti muld ise, omavad olulist mõju risosfääri kooslustele, muutes nende ruumilisi, ajalisi ja funktsionaalseid komponente (Buée et al. 2009).

Erinevate mullas elavate mikroobide poolt vahendatud taime ja mulla vaheline tagasiside saab olla otsene või kaudne. Paljud mikroobid muudavad oma elutegevuse käigus mulla biotilisi ja abiotilisi omadusi ja seeläbi mõjutavad taimede kasvu. Kaudne mõju taime kasvule võib tuleneda mikroobide poolt lagundatava taimeködu omadustest. Samas mõjutavad mikroobid taimi ka otseselt, kui taimede ja risosfääris elavate mikroobide vahel toimuvad vahetud interaktsioonid, näiteks mükoriisa moodustumine või patogeenide otsene kahjulik mõju taimedele (Miki 2012). Mullas elavate mikroobide mõju taimele võib olla kas positiivne (nt mükoriisa) või negatiivne (patogeenid), aga ka neutraalne juhul kui mitme mikroobiliigi mõjusid koos arvestada (Bever 2003; Buée et al. 2009).

Mullas elavate bakterite koosluste struktuuri üks olulisematest mõjutajatest on taime olemasolu. Risosfäär on bakterite jaoks väga dünaamiline elukeskkond ning risosfääris elavaid baktereid mõjutab väga palju erinevaid faktoreid. Näiteks mõjutavad bakterikooslust ja hulka nii taime liik, tema kasvustaadium, kui ka taime juureeritiste koostis (Buée et al. 2009). Risosfääris elavad bakterid võivad olla taimedele kasulikud. Paljud taimeliigid on sümbioosis lämmastikku siduvate bakteritega ning see suurendab taimede jaoks omastatavat lämmastiku hulka ja seeläbi soodustab taimede kasvu (van der Putten et al. 2013). On leitud, et teatud bakterid võivad interaktsioonide abil suruda maha erinevate taimepatogeenide ja seeläbi ka taimehaiguste levikut. Taimepatogeene tõrjuvate bakterite hulka kuuluvad mõned liigid perekonnast *Pseudomonas* ja *Serratia*. Näiteks võivad nad toota seente poolt põhjustatud

haiguste vastu antibiootilist pürroolnitiini (Berg et al. 2002). Kuigi paljud mullas elavatest bakteritest on taimedele kasulikud, elab seal hulk taimedele kahjulikke baktereid, näiteks patogeensed baktereid, kes põhjustavad taimehaigusi (Buée et al. 2009).

Viirused elavad risosfääris paikades, kus on rohkearvulised baktereid. Taimehaigusi tekitavad viirused kasutavad tihti baktereid vektoritena (Canchaya et al. 2003). Protistid kuuluvad samuti mullamikroobide hulka, osaledes nii primaarsete kui sekundaarsete saprotroofidena toiduahelates, kus aitavad kaasa orgaanilise materjali lagundamisele ja mineralisatsiooniprotsessidele. Samas toituvad paljud protistid bakteritest ja võivad bakterikoosluse kaudu avaldada mõju ka taimedele (Adl & Gupta 2006). Arhede elust risosfääris teatakse palju vähem, kui bakterite omast. Kuna arhed suudavad hakkama saada ekstreemsetes keskkondades, siis eelkõige ongi neid uuritud just sellest aspektist. Arhed on taimede juurtes ja nende läheduses tavatingimustes igapäevased ja tagasihoidlikud elanikud. Risosfääris elavad arhed sõltuvad suurema tõenäosusega abiootilistest keskkonnatingimustest. On leitud, et arhed võivad olla olulised lülid erinevates globaalsetes protsessides, näiteks nitrifikatsiooniprotsessis. Mullas võib elada rohkem ammooniumi oksüdeerivaid arhesid, kui ammooniumi oksüdeerivaid prokarüoote (Chen et al. 2008; Leininger et al. 2006). Seega võivad arhed mängida taimede jaoks olulist rolli just spetsiifilistes olukordades, näiteks madala hapnikusisalduse või kõrge CO ja CO₂ korral. Täpsemat arhede rolli risosfääris on veel vähe uuritud (Buée et al. 2009).

Mullamikroobide hulka kuuluvad ka mükoriisaseened, kes elavad taimedega sümbioosis suhtes. Mükoriisaseeni on erinevaid liike, mis moodustavad erinevaid mükoriisa vorme, näiteks ekto-, arbuskulaarne, arbutoidne, monotropoidne, erikoidne ja orhidoidne mükoriisa. Kuigi enamus mükoriiseseid suhteid on kirjeldatud kui mutualistlikud, võib üht tüüpi mükoriisa seenpartner sümbioosis olla eri liiki ja eri vanuses taimedega aga käituda ka parasiitselt. Selline taime ja seene vaheline suhe võib taime eluea jooksul muutuda (Smith & Read 2009). Paljud taimeliigid saavad kasu kasvades mükoriisaseentega koos väheviljakas keskkonnas, kuna mükoriisa hõlbustab taimel mullast toitainete kättesaamist. Lisaks ainevahetusele on mükoriisal roll taime kaitses, näiteks kaitstes taime juuri patogeensete seente eest. Newsham ja teised (1995) leidsid, et AM seenega perekonnast *Glomus* inokuleeritud kõrrelise *Vulpia ciliatia* taimedel olid patogeensete seente poolt juurtele ja võsule tekitatud kahjustused väiksemad, kui inokuleerimata taimedel. Samas ei suurenenud inokuleeritud taimedes fosfori

kontsentratsioon. Seega taimeliigi *Vulpia ciliatia* AM seenega inokuleerimise kasu seisnes pigem kaitses patogeenide rünnaku eest, kuid mitte toitainete omastamise suurendamises. Kui substraadis pole piisavalt sobiliku mükoriisat moodustava seene osiseid, siis on võimalik, et potentsiaalselt mükoriissete taimede juurtes ei moodustu mükoriisa kolonisatsiooni. Taim ei pruugi mükoriisat moodustavate seentega sümbiooset suhet moodustada, kui mullas on piisavalt suur toitainete sisaldus, mille korral on taim võimeline ise hõlpsasti juurtega toitaineid ammutama (Smith & Read 2009). Mükoriisne suhe oleks taime jaoks antud olukorras üleliigne energiakulu. Lisaks võib sümbioosi moodustumiseks ebasobivaks kekskonnatingimuseks olla liialt madal temperatuur ja kõrge mullaniiskus. Mükoriisaseente kolonisatsiooni moodustumine looduses varieerub ka aastaajaliselt (Heinemeyer & Fitter 2004).

Rohttaimede seas on kõige levinumaks mükoriisatüübiks arbuskulaarne mükoriisa (AM). Arbuskulaarset mükoriisat moodustavad seened on obligatoorsed mutualistid ehk nad on võimelised elama vaid koos taimest partneriga. Suur hulk taimeliike on potentsiaalselt võimelised moodustama arbuskulaarset mükoriisat. AM seeni on umbes 300 liiki ja üks seeneliik võib olla sümbioosis erinevate taimeliikide (Smith & Read 2009). Kuigi ühel taimeliigil võib olla hulk AM seeneliike, kellega mutualistlik suhe luua, on siiski leitud, et peremeestaimedel on teatavad eelistused. AM sümbioosis olevate partnerite sobivus ei pruugi olla liigispetsiifiline, vaid võib sõltuda hoopis funktsionaalsetest või ökoloogilistest rühmadest ning seda mõlema sümbioosi osapoole puhul. Tavaliselt metsas kasvada eelistavate taimedega mükoriisat moodustavate AM seente kooslused on omavahel sarnased ning erinevad oluliselt generalistidest taimeliikidele omasest AM seente kooslusest (Öpik et al. 2009). AM seened võivad olla taimede seemnete idanemise hõlbustamiseks oluline tugisüsteem. Taimeliikide mitmekesisus ja koosluse struktuur on samuti mõjutatud AM seente koosluse poolt (van der Heijden et al. 2006). Kuna keskendusime rohumaal kasvavatele taimeliikidele, siis teistel mükoriisa tüüpidel antud töös pikemalt ei peatuta.

1.4 Mulla mikroobne tagasiside ja selle seos taime tunnustega

1.4.1 Taimeliigi ohtruse seos tagasisidega

Taimekooslustes võivad taimeliigid olla esindatud erinevatel ohtruste tasemetel, mõned liigid on koosluses ohtramalt esindatud, teised aga haruldasemad. Seni on püütud osade taimeliikide koosluses domineerimist seletada nii konkurentsi, ressursside jaotumise, levimisvõimekuse, kui vaenlase talumisega (Grace & Tilman 1992). Klironomos (2002) võttis oma uurimuses vaatluse alla hoopis mikroobide ja taimede vahelised interaktsioonid. Patogeenide akumulereerimise kiirus võib olla üheks koosluses olevate liikide ohtrussuhete mõjutajaks. Taimed akumulereerivad liigile omaseid patogeene erineval kiirusel, millest tulenevalt tekib ka negatiivne taimede ja mikroobide vaheline tagasiside liigiti erinevalt (van der Putten et al. 1993). Taimeliigid, mis on koosluses ohtramalt esindatud, akumulereerivad ka patogeene aeglasemalt. Samas on tagasiside domineerivatele liikidele kodumullas ehk mullas kus taimeliik on juba varem kasvanud negatiivne, kuna mikroobidel, sealhulgas patogeenidel, on olnud võimalus mullas pikema aja vältel kuhjuda. Sellises olukorras peavad taimed ise panustama rohkem energiat patogeenidega võitlemisse ning taimede enda keskmine ohtrus langeb. Koosluse tasemel võib patogeenide akumulereerimine toimuda ka aeglasemalt, juhul kui liik on koosluses vähearvukas. Vähemarvukas liik saab võimaluse oma ohtrust suurendada. Liigi edu teiste kõrval kestab kuni taimede tihedus kasvab piirini, kust edasi hakkavad patogeenid liiki suuremal määral mõjutama ning tekib negatiivne tagasiside (Klironomos 2002).

On näidatud, et taime ja mükoriisaseene vaheline interaktsioon võib olla oluline loodusliku taimekoosluse struktuuri kujunemisel. Mükoriissed seosed võivad mõjutada taimeliikide vahelist konkurentsi. Näiteks võib mükoriisaseente olemasolu muuta konkurentsis olevate liikide hierarhiat vastavalt nende sõltuvusele mükoriisast. Olukorras, kus koosluses on olemas mükoriisaseen, võivad mükoriisast sõltuvad taimeliigid domineerida liikide üle, kes otseselt ei sõltu mükoriisast. Samuti vastupidi, olukorras kus puudub mükoriisaseen võivad samad tugevalt mükoriisast sõltuvad liigid jääda alla koosluses esinevatele vähemmükoriissetele taimeliikidele (van der Heijden et al. 2003). Lisaks peab meeles pidama, et taime sõltuvus mükoriisast võib varieeruda ka taime vanusega, näiteks erinevatel taimeliikidel on mükoriisa oluline erinevates eluetappides – idanemisel või hoopis viljumisel (van der Heijden et al. 2006).

1.4.2 Taimede invasiivsuse seos tagasisidega

Invasiivseteks nimetatakse taimeliike, mis on inimese poolt kooslusesse sisse toodud ja on võimelised agressiivselt levima väljaspool liigile omast levilat ning seal ka ellu jääma. Sisse toodud eksootiliste taimede invasiivsuse seletamiseks kasutatakse üha enam taime ja mulla vahelise tagasiside kontseptsiooni (van der Putten et al. 2013). Klassikalise nišiteooria seisukohalt peaksid invasiivsed liigid suutma koos eksisteerida endast erineva ökoloogilise nišiga kohalike liikidega. Lisaks ei tohiks invasiivsete ja kohalike liikide vahel selle seisukoha järgi toimuda märkimisväärseid interaktsioone juurkonkurentidena, küll aga tegelikkuses võib invasiivse liigi levimine tuua kaasa püsivaid tagajärgi kohalikule kooslusele, nagu näiteks mõne kooslusele omase liigi väljasuremine (MacDougall et al. 2009). Võõrliigid võivad muutuda invasiivseteks, kuna neil puuduvad uutel aladel looduslikud vaenlased (patogeenid, parasiidid), kes reguleeriks nende ohtrust. Niidul kasvavatel sissetoodud taimeliikidel võib olla mullaga kas neutraalne või positiivne tagasiside, ehk nad akumulatsioonivad vähem kohalikke patogeene (Klironomos 2002). See aga ei tähenda, et need taimeliigid üldse negatiivset tagasisidet ei kogeks. Invasiivsed liigid ei pruugi domineerida alguses ehk kodukoosluses, kus neil võib olla mullaga ka negatiivne tagasiside. Uurimistööd ongi näidanud, et invasiivsed taimeliigid, mis kogevad kodukoosluses negatiivset tagasisidet, võivad uude kooslusesse introductseerituna omada mullaga ka neutraalset või positiivset tagasisidet (van der Putten et al. 2013).

1.4.3 Erinevate taime elukäigutunnuste seos tagasisidega

Taime elukäigutunnuste abil on võimalik seletada mikroobikoosluste varieeruvust ja funktsioneerimist nii taimeisendi, kui taimekoosluse tasandil. Erinevad taimetunnuste ja mullaressursside kvaliteedi ja/või kvantiteedi vahelised suhted mõjutavad omakorda mulla mikroobikoosluse ülesehitust ja aktiivsust. Taime elukäigutunnuste seost tagasisidega on näha aeglase kasvuga taimeliikidel. Aeglase kasvuga taimedel on kudede lämmastiksisaldus madal või lehe eripind (SLA) väike. Sellised taimed produtseerivad seega madalama kvaliteediga ressursside sisendeid (lehekõdu) ja seeläbi soodustavad mullas toimuvaid mükoriisseid toiduvõrgustikke, mis on omakorda seotud aeglase lämmastikuringega. Kiirekasvulistel taimeliikidel võib seevastu olla kudedes kõrge lämmastiku sisaldus ja suur SLA. Seega produtseerivad kiirekasvulised taimed suurema toitainetesisaldusega ressursside

sisendeid mulda, mis soodustab mullas bakteritel põhinevaid toiduahelaid ning seega on seotud kiire toitainete ringlusega (Baxendale et al. 2014; Orwin et al. 2010).

1.5 Mullamikroobide olulisus taimekoosluse funktsioneerimisel

Taimekooslused varieeruvad nii oma liigiliselt mitmekesisuselt kui sellele vastavalt mikroobikoosluselt. Mikroobikoosluste dünaamika võib seega mõjutada taimeliikide kooseksisteerimist kaudse tagasiside kaudu taimepopulatsioonile (Bezemer et al. 2006; Casper & Castelli 2007; van der Putten et al. 2013). On näidatud, et taimeliigid erinevad oma tagasisidelt erinevatele mikroobidele, ehk nii negatiivsed interaktsioonid risofääri patogeenidega, kui positiivsed suhted mullas elavate sümbiontidega on taimeliigispetsiifilised (Bever et al. 2010). Mikroobid võivad muuta taimekoosluses olevat liikide mitmekesisust, mõjutades nii liikide ohtrust või haruldust, kui ka invasiivsete liikide püsijäämist koosluses (Klironomos 2002). Näiteks olukorras, kus kohalikud taimeliigid sõltuvad mükoriisaseente olemasolust, kuid introductseeritud taimeliikidele pole see oluline, võib keskkonnahäiringule järgneda võõrliikide domineerimine, mis edaspidi pärsiks kohaliku floora taastumist (Bever et al. 2010).

Taimede poolt põhjustatud muutused mulla mikroobikoosluses ja toitainete kättesaadavuses võivad mõjutada järgmiste samal mullal kasvavate taimede kasvu ja seeläbi taimede liigisisese ja liikidevahelise konkurentsi tulemusi. Koosluses kasvavate taimede vahelisi konkurentsisuhteid muudab AM juhul, kui konkurentsisis nõrgem taim saab mükoriisast rohkem kasu kui muidu tugevam konkurent ja seeläbi võib olla soodustatud liikide kooseksisteerimine (van der Heijden et al. 2003). Erinevate taime ja mulla vaheliste tagasisidemehhanismide parem mõistmine võimaldaks meil ennustada selliste interaktsioonide tagajärgi taimekoosluste koosseisule ja produktiivsuse sõltuvust mulla mikroobsetest tingimustest (van der Putten et al. 2013).

1.6 Magistritöö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on uurida, kuidas AM seente olemasolu mullas mõjutab tugevalt ja nõrgalt mükoriisast sõltuvate taimeliikide ja mulla vahelist tagasisidet. Uurimistööd tehes oletame, et AM seente olemasolu mullas mõjutab taimeliikide tagasisidet erinevalt. Tugevalt mükoriissete liikide ja mulla vaheline tagasiside mullal, kus taimeliik on ise varem kasvanud, on positiivsem, kui mükoriisast vähem sõltuvatel liikidel. Tagasiside tugevuse erinevus tuleneb sellest, et tugevalt mükoriissete taimeliikide puhul on suhe mullamikroobidega positiivsem ja vähemükoriissetel liikidel negatiivsem (Hartnett et al. 1993). Samuti võib taime ja mulla vaheline tagasiside sõltuda varem mullal kasvanud taimeliigi mükoriisuse tugevusest. Liigid, mis on tugevalt mükoriisunud, võiksid kasvada paremini teiste tugevalt mükoriissete liikide mullal ja vähemükoriissete liikide puhul vastupidi (Harrison & Bardgett 2010). Pole teada, kuhu vahele jääb kasv enda mullal, kuna sellisel juhul tulevad mängu taimeliigile omased patogeenid (Klironomos 2002).

Sellest lähtudes olid käesoleva magistritöö peamisteks hüpoteesideks:

1) Tugevalt mükoriisast sõltuvad taimeliigid kasvavad mükoriisaseente olemasolul mullas paremini teiste tugevalt mükoriissete liikide mullal, seejärel oma mullal ja kõige halvemini vähemükoriissete liikide mullal.

2) Mükoriisast vähem sõltuvad liigid kasvavad mükoriisaseente olemasolul mullas paremini teiste vähemükoriissete liikide mullal, siis oma mullal ja kõige halvemini tugevalt mükoriissete liikide mullal.

3) Kui mullas puudub mükoriisaseen, siis kasvavad kõik liigid paremini teiste liikide mullal, vaatamata nende mükoriisest sõltuvusest, võrreldes enda mullaga.

Et testida hüpoteese, viidi läbi taim-muld-taim tagasiside katse, kasutades loopealsetel kasvavaid rohundeid ja kõrrelisi.

2. Materjal ja metoodika

2.1 Ülevaade katses kasutatud taimeliikidest

Selleks, et teada saada, kuidas erinevad taimeliigid reageerivad mikroobsele tagasisidele, kasutati kahest faasist koosnevat potieksperimenti. Mõlemas katse faasis kasutatud taimeliikide seemned korjati Lääne-Eestis asuvalt puisniidult ja looniidult, mis on olnud juba sajandeid kasutusel niidetava ning karjatatava alana. Pooled eksperimendi tarbeks kogutud liikide seemnetest olid pärit Lääne-Eestist, Virtsu lähedal asuvalt Laelatu puisniidult. Laelatu puisniidul on teadaolevalt nii Eesti kui kogu Põhja-Euroopa kõige liigirikkam taimekooslus (Kull & Zobel 1991). Teine pool katses kasutatud taimeliikide seemnetest olid pärit Uisu looniidult, mis asub Laelatust vaid mõne kilomeetri kaugusel. Loopealset ala iseloomustab õhuke mullakiht. Sellest hoolimata on loopealsed mullad siiski väga viljakad ja suure huumusesisaldusega, ning sellest tulenevalt on seal väga kõrge liigirikkus (Paal 1997). Katses kasutati kokku kümmet taimeliiki.

Katses kasutatud Laelatu puisniidult pärit taimeliikide kirjeldus:

Briza media L.- keskmine värihein on kõrreliste (*Poaceae*) sugukonda kuuluv väikeste puhmikutena kasvav hallikasroheline taim. Taim võib kasvada 20-60, harva ka 100 cm kõrguseks, millest pikk ja laiuv pööris moodustab 6-10 cm. *Briza media* on väga tavaline Eesti niitudel, puisniitudel ja metsalagendikel (Leht 2007). Kuna kõrrelistel on palju peenikesi imijuuri, siis ei vaja nad otseselt toitainete ammutamiseks mükoriisa abi ja seega on kõrrelised ka vähem mükoriissed. *Briza media* kohta on teada, et taimeisendid võivad olla ka vähesel määral AM seente poolt koloniseeritud (Börstler et al. 2006; Tawaraya 2003).

Carex flacca L.- vesihaljas tarn on sinakasrohelistele lehtedega hõremurusjalt kasvav 20-90 cm kõrgune lõikheinaliste (*Cyperaceae*) sugukonna esindaja. Liiki iseloomustavad väikese rao otsas ripuvad pähikud, mis on valminult peaaegu mustad. Tihti võib liiki kohata lubjarikastel niisketel niitudel, paiguti ka rannikul (Leht 2007). Perekonna *Carex* esindajate mükoriissus võib sõltuda keskkonnatingimustest. 23 erineval perekonda *Carex* kuuluval liigil on mükoriissust uuritud ning näidatud, et 16 neist olid mingil määral mükoriisaseene poolt koloniseeritud

(Miller et al. 1999). Samas on osade *Carex* liikide puhul näidatud ka mittemükoriisust (Börstler et al. 2006). *Carex flacca* võib kasvada edukalt ka ilma mükoriisaseeneta (Dostalek et al. 2013).

Prunella vulgaris L.- harilik käbihein on huulõieliste (*Lamiaceae*) sugukonda kuuluv, 5-30 cm kõrguseks kasvav tõusva varrega taim, mis võib oma vartel olevatelt sõlmekohtadelt juurduda. Väga tavaline liik teeservadel, niitudel ja hõredates metsades (Leht 2007). On leitud, et liik on mükoriisast tugevalt sõltuv (Bezemer et al. 2006; Young et al. 2015).

Succisa pratensis Moench- harilik peetrileht on uniohakaliste (*Dipsacaceae*) sugukonna esindaja. Taim võib kasvada 20-90 cm kõrguseks. *Succisa pratensis* ümarad ja terveservalised lehed paiknevad vastakult ning on pisut karvased. Iseloomulikud sinakaslillad, vahel ka valged või roosad õied on koondunud kerajateks nuttideks. Liik on tavaline nii madalsoodes kui niitudel (Leht 2007).

Leontodon hispidus L.- kare seanupp kuulub korvõieliste (*Asteraceae*) sugukonda. *Leontodon hispidus* on tavaliselt 15-50 cm kõrgune, üleni karekarvane taim. Õisikuid on varre otsas alati ainult üks. Väga tavaline liik Eesti niitudel (Leht 2007). On leitud, et *L. hispidus* on suhtest mükoriisaseentega tugevalt sõltuv (Tawaraya 2003).

Katses kasutatud Uisu looniidult pärit taimeliikide kirjeldus:

Festuca rubra L.- punane aruhein on kõrreliste sugukonna esindaja. *Festuca rubra* võib kasvada 15-90 cm kõrguseks ning tema lehepooled on lapiti kokku keeratud ja siledad. Liiki on lihtne ära tunda alumiste lehetuppede järgi, mis on punased ja karvased, servadelt paljad. Tavaline liik niitudel ja teeservades (Leht 2007). Vaatamata oma kuulumisele kõrreliste hulka, on *Festuca rubra* liik millel võib esineda ka AM seente kolonisatsiooni (Börstler et al. 2006). Siiski on leitud, et *F. rubra* biomass on suurem kasvades ilma mükoriisaseeneta (Tawaraya 2003).

Carlina vulgaris L.- harilik keelikurohi kuulub korvõieliste sugukonda. Taim võib kasvada 10-70 cm kõrguseks ning on torkav nagu ohakas. Liigile *Carlina vulgaris* on iseloomulikud peaaegu tervete kuni üpris suurte hõlmadega lehed. Kasvab Eestis paiguti lubjarikastel niitudel ja teeservades, tavaline Lääne-Eestis ja saartel (Leht 2007). Tavaliselt on *C. vulgaris* looduses vähese AM kolonisatsiooniga, kui üldse (Jong et al. 1995).

Galium verum L.- hobumadar on madaraliste (*Rubiaceae*) sugukonda kuuluv taimeliik, mille teravatipulised lehed on tumerohelised ja läikivad, leheservad allapoole käärdunud ja õied tumekollased. Kasvab paiguti kuivadel niitudel (Leht 2007). Tawaraya (2003) järgi on liigi *G. verum* puhul on täheldatud ka mükoriisast sõltuvust, kuid puudub AM seente kolonisatsioon.

Pimpinella saxifraga L.- harilik näär kuulub sarikaliste (*Apiaceae*) sugukonda. 15-60 cm kõrguseks kasvav taim on pisut karedakarvane. *P. saxifraga* on tavaline liik kuivadel niitudel ja luidetel (Leht 2007). *P. saxifraga* on mükoriisne (Pawlowska et al. 1996).

Silene vulgaris (Moench) Garcke- harilik põisrohi on nelgiliste (*Caryophyllaceae*) sugukonna esindaja. Taim võib kasvada 20-70 cm kõrguseks. Valkjad kuni lillakad õietuped on põisjad ja paljad. Liik on tavaline Eesti tee- ja põlluservadel, kuivematel niitudel ja hõredates metsades (Leht 2007). Kuigi *S. vulgaris* kuulub rohundite hulka, on liiki määratud mittemükoriisne (Pawlowska et al. 1996).

2.2 Potikatse ülesehitus

2.2.1 Katse I faas - mulla ettevalmistamine ja taimeliikide mükoriisne vastus

Katse esimese faasi eesmärgiks oli teada saada, milline on väljavalitud taimeliikide mükoriisne vastus. Katse esimeses faasis toimus mulla ettevalmistamine katse teise faasi jaoks. Esmalt valmistati ette katsepottidesse mineva mulla põhiosa, mille moodustas steriliseeritud mullasegu. Muld pärines toitainerikkast loopealse kooslusest ning segati liivaga vastavalt üks osa loopealse mulda ja kaks osa liiva, et soodustada vee liikumist. Muld steriliseeriti eelnevalt gammakiirgusega, et lahti saada taustamikroobidest, samas säilitades mullas olevad toitained. Ühte potti pandi 1,4 kg steriliseeritud mullasegu. Selleks, et luua mükoriisne (MYC) ja mittemükoriisne (noMYC) töötlus, lisati seejärel potti 300 g kas steriliseerimata ehk elusa mulla või steriliseeritud mulla inokulaat, mis valmistati vastavast päritolukooslusest kogutud mullast (Laelatu või Uisu). Steriliseerimata mulla inokulaat oli MYC töötluse aluseks, kuna elusas mullas peaks potentsiaalselt olema päritolukoosluse AM seente osised (hüüfid, spoorid), seega töötluses MYC saavutati loodusliku lähedane mikroobikoosus. Seejärel lisati kõikidesse pottidesse 60 ml vedelat inokulaati (mikroobilahust). Vedel inokulaat valmistati 1,06 kg vastava koosluse steriliseerimata elusmullast ning viiest liitrist veest, mida segati pidevalt. Mullalahus kallati läbi sõelte, kõige väiksema sõela silma läbimõõt oli 32 µm. Protsessi käigus filtreeriti välja ka võimalikud väikseimad AM seente osised ning lahusesse jäid

järele vaid 32 µm väiksemad mullamikroobid (bakterid, viirused jne). Seega mittemükoriisises (noMYC) töötluses puudusid küll looduslikust kooslusest pärit AM seente osised (hüüfid, spoorid), kuid olid olemas ülejäänud looduslikus koosluses esinevad 32 µm väiksemad mullamikroobid. Mükoriisises (MYC) töötluses olid olemas kõik kooslusele omased mullamikroobid, kaasaarvatud AM seened.

Taimedelt kogutud seemned külvati 2015. aasta märtsis liikide kaupa steriilsesse kvartsi. Aprilli alguses istutati idandid ümber kaheliitristesse plastikust pottidesse. Iga liigi kohta oli mõlemast töötlusest seitse replikaati ehk seitse potti mükoriisata (noMYC) mullasegu ja seitse potti mükoriisaga (MYC) mullasegu. Igas potis kasvatati koos kolm samast kooslusest pärit sama liigi isendit. Istutamisel paigutati taimed potis nii, et taim ei satuks poti servale lähemale kui 4 cm ja taimede kaugus üksteisest oleks 5 cm. Istutamise lihtsustamiseks oli valmistatud šabloon. Istutamisele järgneva kahe nädala jooksul surnud isendid asendati. Taimed kasvasid kasvuhuones lampide all kaks kuud (aprilli algusest mai lõpuni). Iga kahe nädala tagant juhuslikustati pottide asetust, et vältida mikroklimaatilisi kasvutingimuste erinevusi.

2.2.2 Katse II faas – mulla ja taimede vaheline tagasiside

Katse teine faas keskendus mulla ja taimede vahelisele tagasisidele. Selles faasis kasutati taimede kasvatamiseks esimesest katse faasist pärit mulda. Iga liigi kohta, mida katse esimeses faasis kasvatati, valiti nii MYC kui noMYC töötlusest viis potti (eelnevalt kokku seitse), milles olnud taimede kogubiomass oli suurim. Igas potis olnud muld võeti välja ning pandi eraldi kilekotti. Muld ja selles olnud juured tehti käsitsi katki, selle juures kanti ühekordseid kummikindaid, et mikroobe eri töötluste vahel mitte segi ajada. Kilekotis olnud 1,5 kg mullale lisati 1,5 kg steriliseeritud mullasegu (üks osa loopealse mulda ning kaks osa liiva, steriliseeritud gamma-kiirgusega, nagu ka I faasis) ning segati võimalikult ühtlaseks. Kotis olnud mullast eraldati 30 g mullaproov toitainete analüüsi tarbeks. Seejärel jagati saadud mullasegu viie uue poti vahel. Katse jaoks kasutati 0,5-liitrisel plastikust potte.

Katses teises faasis kasvatatud liikide hulka kuulusid viis liiki Laelatult (*Briza media*, *Carex flacca*, *Prunella vulgaris*, *Succisa pratensis*, *Leontodon hispidus*) ning neli liiki Uisult (*Festuca rubra*, *Carlina vulgaris*, *Galium verum*, *Silene vulgaris*). *Pimpinella saxifraga* seemnete vähesuse tõttu jäi see liik katse II faasist välja. Liigid kasvasid kas oma (MYC/noMYC) mullal või teiste samast kooslusest liikide (MYC/noMYC) muldadel. Ühe istutatud liigi kohta kasutati 50

potti, seega oli katse II faasis kokku 450 potti. Esmalt istutati liigid esimeses katse faasis olnud noMYC mullaga pottidesse ning seejärel MYC töötusega mullaga pottidesse. Istutamisel paigutati taimed poti keskele. Istutamisele järgnenud kahe nädala jooksul surnud isendid asendati. Taimed kasvasid kasvuhuones lampide all kaks kuud (veebruari lõpust aprilli lõpuni). Ka selles katse faasis juhuslikustati taimede asukohti kasvulavatsil iga kahe nädala tagant.

2.3 Mõõtmised

2.3.1 Katse I faas

Pärast kaheksat nädalat kasvatamist, lõigati taimede maapealsed osad, mis koguti poti kaupa eraldi ümbrikutesse. Taimi kuivatati 48 tundi 75°C juures kuivatuskapis. Kõikide pottide maapealne biomass kaaluti 0,0001 g täpsusega. Katse mahavõtmise teiseks etapiks oli mullaproovide võtmine. Mullaproovid koguti proovitoruga (diameetriga 2,5 cm) iga poti keskpunktist (kolme taime keskelt). Toru puhastati iga proovi võtmise järel ning steriliseeriti valgendiga eri töötluste vahel. Mullaproovist eraldati juured, mis pandi ümbrikutesse ja kuivatati 50°C juures 48 tundi. Juurte biomass kaaluti 0,0001 g täpsusega.

Kogutud ja kuivatatud juuri kasutati juurtes oleva AM kolonisatsiooni hindamiseks. Kuivatatud juured pandi eraldi märgistatud katseklaasidesse ning lisati 2,5% kaaliumhüdrosiidi lahust, milles juuri hoiti ligikaudu 24 tundi. Seejärel vahetati lahus uue vastu ning katseklaasides olevaid juuri kuumutati vesivannis 90°C juures 5-10 minutit. Selitamine eemaldab juurerakkude tsütoplasma, kuid jätab juure struktuuri ja seenerakud terveks. Selitamiseks kuluv aeg sõltub taimeliigist- heledad lihavad juured vajavad lühemat selitamist, kuid tumedate juurte puhul võis vajalik olla ka täiendav pleegitamine 30% vesinikperoksiidiga (toatemperatuuril). Pärast selitamist loputati juured hoolikalt voolava veega. Seejärel toimus juurte hapestamine, tagamaks värvi kinnitumist. Katseklaasis olevatele loputatud juurtele lisati 4 % HCl ning lasti seista ligikaudu 30 min toatemperatuuril. Hapestatud juuri värviti 0,05% trüpaansinise lahusega (0,05 g trüpaansinist + 100 ml happelise glütseriini lahust) ja kuumutati vesivannis 90°C juures 10 minutit. Juurte värvimise viimaseks etapiks oli värvitustamine, mille käigus valati juurtele happelise glütseriini lahust ning lasti toatemperatuuril seista päev või kauem (Koske and Gemma 1989). Juurtest tehti preparaadid, mida vaadati mikroskoobi all (400x suurendusega), et hinnata mükoriisaseente poolt koloniseeritud juurte osakaalu (McGonigle et al. 1990).

AM kolonisatsiooni hindamiseks kasutasin meetodit, mille puhul tuvastasin preparaadis ühtlaselt kaadrise jääva ja keskjoont läbiva arbuskulaarsele mükoriisale omase tunnuse: kui juurega risti olev keskjoon läbis kas mükoriisa hüüfi, arbuskulit või vesiikulit siis märkisin vastavalt protokollile tabelisse tunnuse olemasolu. Kui vaateväljas puudusid eelmainitud AM omased tunnused, siis märkisin selle vastavasse tabelilahtrisse (McGonigle et al. 1990). Mükoriisa olemasolu hindamiseks valisin iga liigi MYC töötlustest 3 potti (1 kõige suurema biomassiga ning 2 juhuslikult) ja iga liigi noMYC töötlustest 1 poti (kõige suurema biomassiga). Tulevikus on edaspidiste analüüside tarbeks plaanis hinnata kõikide ülejäänud taimeisendite AM kolonisatsioon.

2.3.2 Katse II faas

Kahe kuu möödudes katse algusest koguti kõikide taimede maapealne biomass ning kuivatati seejärel 48 tundi 75°C juures kuivatuskapis. Samuti koguti ja pesti kogu taime maa-alune biomass. Maa-alune biomass pandi eraldi ümbrikutesse ning kuivatati 40°C juures 72 tundi. Kõikide isendite maapealne biomass kaaluti eraldi 0,0001 g täpsusega. Taimede maa-alune biomass on plaanis kaaluda edaspidiste analüüside tarbeks, samuti on plaanis hinnata AM seente kolonisatsiooni taimejuurtes.

2.4 Andmeanalüüs

2.4.1 Katse I faas

Algandmete statistiliseks analüüsiks kasutati andmetöötlusprogrammi Statistica 13. Töötluste vaheliste biomasside erinevuse analüüsimiseks arvutasin kõikide liikide MYC ja noMYC töötluste keskmised kogubiomassid (maa-alune ja maapealne biomass) potis kasvanud taimeisendite kohta. Biomasside keskmised jagati läbi katse lõpuks potti jäänud isendite arvuga, kuna mõnedes pottides oli katse alguses istutatud kolme taime asemel järele jäänud üks või kaks isendit. Uurimistöös võeti sõltuvaks muutujaks potis kasvanud taimeisendi keskmine kogubiomass ning sõltumatute muutujatena kasutati taimeliiki ja mulla mikroorganismide mõju (MYC ja noMYC töötlusted). Sõltumatute muutujate mõju leidmiseks sõltuvale muutujale kasutati faktoriaale ANOVA (tüüp II) mudelit. Leidmaks sõltumatute muutujate tasemete vahelisi erinevusi tehti Tukey post-hoc analüüs. Tukey testiga saab teha ANOVA tulemuste võrdlemist läbi kõikvõimalike tasemepaaride.

MYC ja noMYC töötluste juureproovides oleva AM kolonisatsiooni hindamisel saadud andmete põhjal arvasin AM kolonisatsiooni osakaalu. Et teada saada ühe liigi kohta meid huvitava AM tunnuse ehk arbuskulite (A), vesiikulite (V) või hüüfide (H) osakaalu kõikidest tehtud vaatlustest, jagati meid huvitava tunnuse fikseeritud vaatluste arv kõikide liigi kohta fikseeritud vaatluste arvuga.

Lisaks arvasin töötluste (MYC ja noMYC) vahel taime liikide kogu biomasside keskmiste põhjal liigi suhtelise mükoriissusest sõltuvuse indeksi (RMD – *relative mycorrhizal dependency*). Selleks kasutasin RMD arvutamiseks mõeldud valemit (1).

(1)

$$RMD = \frac{(M_{MYC} - M_{noMYC}) * 100}{M_{MYC}}$$

M_{MYC} – mükoriisses töötluses kasvanud taime kuivmass (keskmine kogubiomass) (g)

M_{noMYC} – mittemükoriisses töötluses kasvanud taime kuivmass (keskmine kogubiomass) (g)

2.4.2 Katse II faas

Andmed liikide valitud tunnuste kohta pärinesid: antud katse mõõtmistulemused (maapealne biomass), RMD katse I faasi tulemustest. Segamudeliga uuriti töötluste mõju standardiseeritud maapealsele biomassile. Fikseeritud uuritavateks mõjudeks olid 1) mükoriisa töötlus (MYC/noMYC) 2) Enda/võõras_GR kombineeritud indeks, mis sisaldas endas nii eelnevalt mulla konditsioneerimist enda või võõra liigi poolt (enda/võõras) ja eelnevalt mulla konditsioneerinud liigi kasvuvormi sama või erineva kasvuvormi (G/R) poolt. Juhusliku faktorina oli mudelis pott, millest töötluse muld pärines. Selle juhusliku faktori sisse on peidetud faktoritena kooslus, kus potis kasvanud taim pärines ning taime liik. Andmete statistiliseks analüüsiks kasutati andmetöötlusprogrammi SAS. Lisaks uuriti dispersioonanalüüsiga erinevates mükoriisatöötlustes kasvamise ja eelnevalt mulda konditsioneerinud liigi omaduste mõju graminoidide ja rohundite biomassidele. Andmeid analüüsiti andmetöötlusprogrammiga Statistica 13.

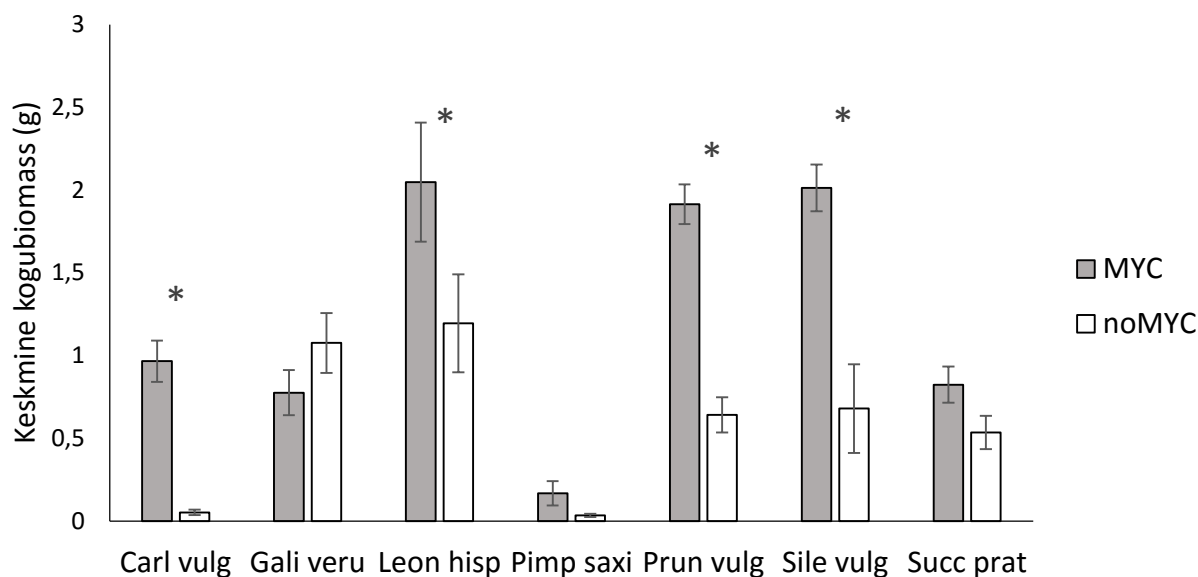
3. Tulemused

3.1 Katse I faasi töötuse mõju taimeliikide biomassile

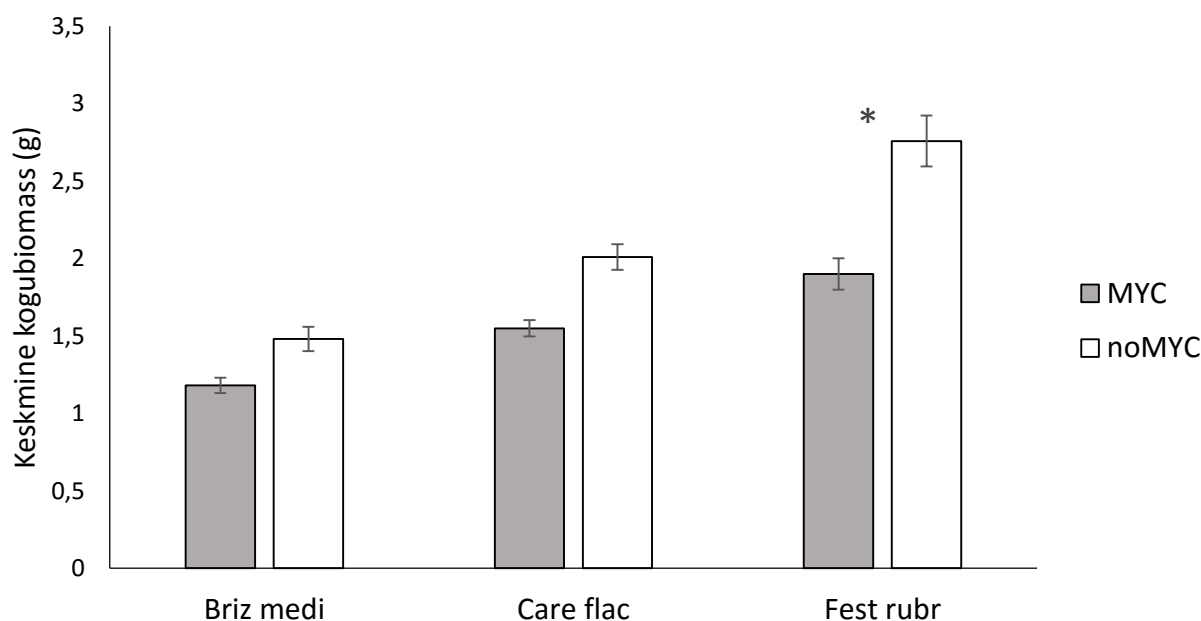
Katse esimeses faasis toimus kahest kooslusest pärit taimeliikide idandite kasvatamine oma koosluse mullal, kas koos oma koosluse mikroobidega, välja arvatud mükoriisaseened (töötus noMYC) või oma kooslusest pärit kõikide mullamikroobidega (töötus MYC). Taimede keskmisele kogubiomassile ilmnis oluline taimeliigi ning töötuse koosmõju ($F_{9,118}=12,1$; $P \leq 0,0001$). Sellest nähtub, et eri taimeliikidele mõjus AM seente olemasolu mullas erinevalt.

Töötuste (noMYC/MYC) mõju katsesse valitud rohundite kogubiomassidele potis kasvanud isendite kohta on illustreerivalt toodud tulpdiagrammina (Joonis 1). Rohundite (välja arvatud *Galium verum*) biomassid olid suuremad MYC töötuses. Katses kasvatatud rohunditest tulid töötuste vahelised erinevused Tukey testi järgi statistiliselt oluliseks liikidel *Carlina vulgaris*, *Leontodon hispidus*, *Prunella vulgaris* ja *Silene vulgaris*. Ülejäänud rohundite liikidel töötuste vahelist statistiliselt olulist erinevust ei leitud.

Töötuste (noMYC/MYC) mõju katsesse valitud graminoidide kogubiomassidele potis kasvanud isendite kohta on illustreerivalt toodud tulpdiagrammina (Joonis 2). Kõigi kolme katses kasvatatud graminoidi biomass oli suurem noMYC töötuses. Vaid liigi *Festuca rubra* keskmised kogubiomassid olid töötuste vahel statistiliselt erinevad.



Joonis 1. Töötuse (noMYC/MYC) mõju katse esimeses faasis kasvatatud rohundite kogubiomassile. Tulpade kohal olevad tärnid tähistavad töötluste vahelist olulist liigisisest biomasside erinevust ($P < 0,05$). Vearibadega on tähistatud standard viga. Tabelis kasutatud lühendid: Carl vulg – *Carlina vulgaris*; Gali veru – *Galium verum*; Leon hisp – *Leontodon hispidus*; Pimp saxi – *Pimpinella saxifraga*; Prun vulg – *Prunella vulgaris*; Sile vulg – *Silene vulgaris*; Succ prat – *Succisa pratensis*.



Joonis 2. Töötuse (noMYC/MYC) mõju katses kasvatatud graminoidide kogubiomassile. Tulpade kohal olevad tärnid viitavad liigisisesele töötluste vahelisele olulisele erinevusele ($P < 0,05$). Vearibadega on tähistatud standard viga. Tabelis kasutatud lühendid: Briz medi – *Briza media*; Care flac – *Carex flacca*; Fest rubr – *Festuca rubra*.

3.2 Katse I faasi töötluste mõju taimede AM kolonisatsioonile

Katse I faasis kasvasid liigid kas koos või ilma AM seenteta. Selleks, et teada kas töötlus omas mõju AM seente kolonisatsioonile juurtes, arvutati erinevate liikide AM seentega koloniseerituse osakaal MYC töötlustes (Tabel 1). Kõikide hindamiseks valitud taimede juurtes oli MYC töötluste puhul olemas AM seente kolonisatsioon. Graminoidide juurtes oli AM kolonisatsioon võrreldes rohunditega üldiselt väiksem. Kõige vähem koloniseeritud oli *Carex flacca*, kus kolmest preparaadist ühes leiti seenehüüfide olemasolu. Suurimad AM kolonisatsioonid olid rohundite hulka kuuluvatel liikidel *Succisa pratensis* ja *Pimpinella saxifraga*.

Tabel 1. Katse I faasis kasvatatud liikide MYC töötlustest valitud kolme poti juure preparaatide põhjal määratud liigi AM seente kolonisatsiooni osakaal. Tabelis kasutatud lühendid: AC – arbuskulite osakaal kõikidest vaatlustest; VC – vesiikulite osakaal kõikidest vaatlusest; HC – hüüfide osakaal kõikidest vaatlustest.

Laelatu	Rohundid (R)			Graminoidid (G)	
	<i>Prunella vulgaris</i>	<i>Succisa pratensis</i>	<i>Leontodon hispidus</i>	<i>Briza media</i>	<i>Carex Flacca</i>
AC	0,047	0,152	0,086	0,089	0
VC	0,095	0,066	0,047	0,003	0
HC	0,409	0,605	0,547	0,226	0,016

Uisu	Rohundid (R)			Graminoidid (G)	
	<i>Carlina vulgaris</i>	<i>Galium verum</i>	<i>Pimpinella saxifraga</i>	<i>Silene vulgaris</i>	<i>Festuca Rubra</i>
AC	0,095	0,096	0,162	0,059	0,034
VC	0,053	0,017	0,039	0,024	0,012
HC	0,557	0,395	0,606	0,261	0,118

Võrdlemaks töötlusti omavahel, loendati üle ka noMYC töötlustes olnud igast liigist suurima taime kogubiomassiga potist pärit juureproovi AM seente kolonisatsioon (Tabel 2). Kolmest preparaadist leiti väga minimaalne AM seente kolonisatsioon. Ilmselt on saastus tekkinud pottide juhuslikustamise käigus või pärineb õhust. Siiski võib öelda, et töötluste vaheline biomasside erinevus on seotud AM seente olemasolu või puudumisega töötlustes.

Tabel 2. Katse I faasis kasvatatud liikide noMYC töötlustest valitud kolme poti juure preparaate põhjal määratud liigi AM seente kolonisatsiooni osakaal. Tabelis kasutatud lühendid: AC – arbuskulite osakaal kõikidest vaatlustest; VC – vesiikulite osakaal kõikidest vaatlusest; HC – hüüfide osakaal kõikidest vaatlustest.

Laelatu	Rohundid (R)			Graminoidid (G)	
	<i>Prunella vulgaris</i>	<i>Succisa pratensis</i>	<i>Leontodon hispidus</i>	<i>Briza media</i>	<i>Carex Flacca</i>
AC	0,029	0	0	0	0
VC	0	0	0	0	0
HC	0,097	0	0	0	0

Uisu	Rohundid (R)			Graminoidid (G)	
	<i>Carlina vulgaris</i>	<i>Galium verum</i>	<i>Pimpinella saxifraga</i>	<i>Silene vulgaris</i>	<i>Festuca Rubra</i>
AC	0	0	0	0,019	0
VC	0,009	0	0	0	0
HC	0,237	0	0	0,038	0

3.4 Katses kasutatud liikide RMD

Kuna katse MYC töötlustes leidsime, et taimedel on olemas AM seente kolonisatsioon ja noMYC töötlustes kolonisatsioon puudub, siis on alust arvata, et töötluste vaheline erinevus tuleneb AM seente olemasolust mullas. Arvutati taimeliikide suhteline mükoriissusest sõltuvuse indeks (Tabel 3), millest selgus, et liigid sõltuvad mükoriisse suhte olemasolust või puudumisest erineva tugevusega. Kõige tugevamalt mükoriissed liigid on rohundite hulka kuuluvad *Carlina vulgaris* ja *Pimpinella saxifraga*, kõige vähem mükoriisseks osutus liik *Galium verum*, kuid ka kõik graminoidid näitasid negatiivset seost AM seentega koos kasvades.

Tabel 3. Liikide suhteline mükoriissusest sõltuvus (RMD).

Laelatu	Rohundid (R)			Graminoidid (G)	
	<i>Prunella vulgaris</i>	<i>Succisa pratensis</i>	<i>Leontodon hispidus</i>	<i>Briza media</i>	<i>Carex flacca</i>
RMD	65,72	3,01	33,41	-25,39	-29,75

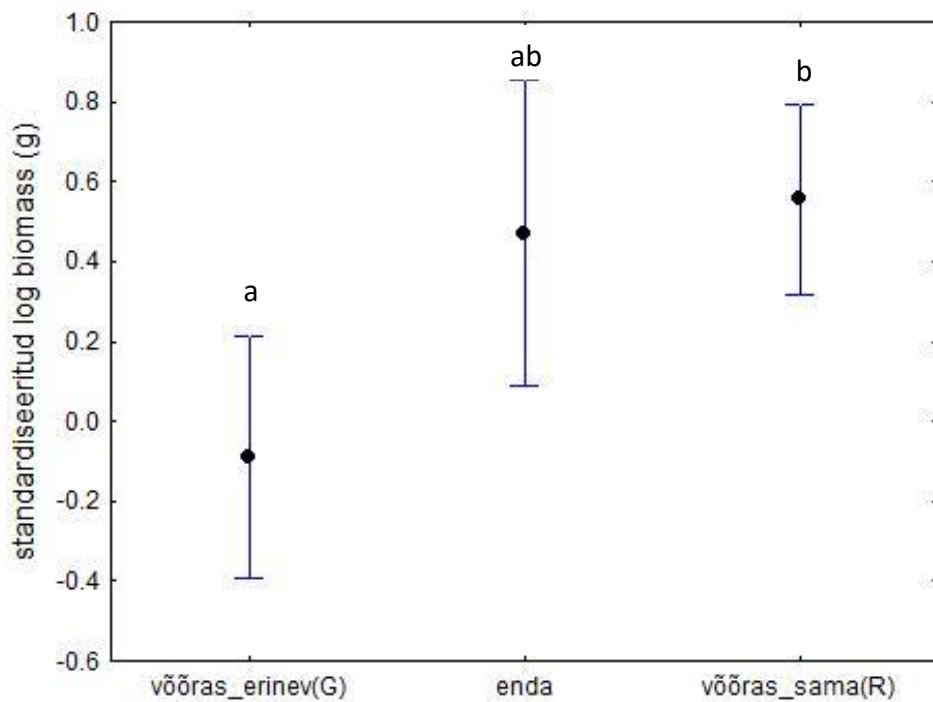
Uisu	Rohundid (R)			Graminoidid (G)	
	<i>Carlina vulgaris</i>	<i>Galium verum</i>	<i>Pimpinella saxifraga</i>	<i>Silene vulgaris</i>	<i>Festuca rubra</i>
RMD	94,28	-62,01	78,27	64,21	-45,21

3.5 Katse II faasi töötluste mõju maapealsele biomassile

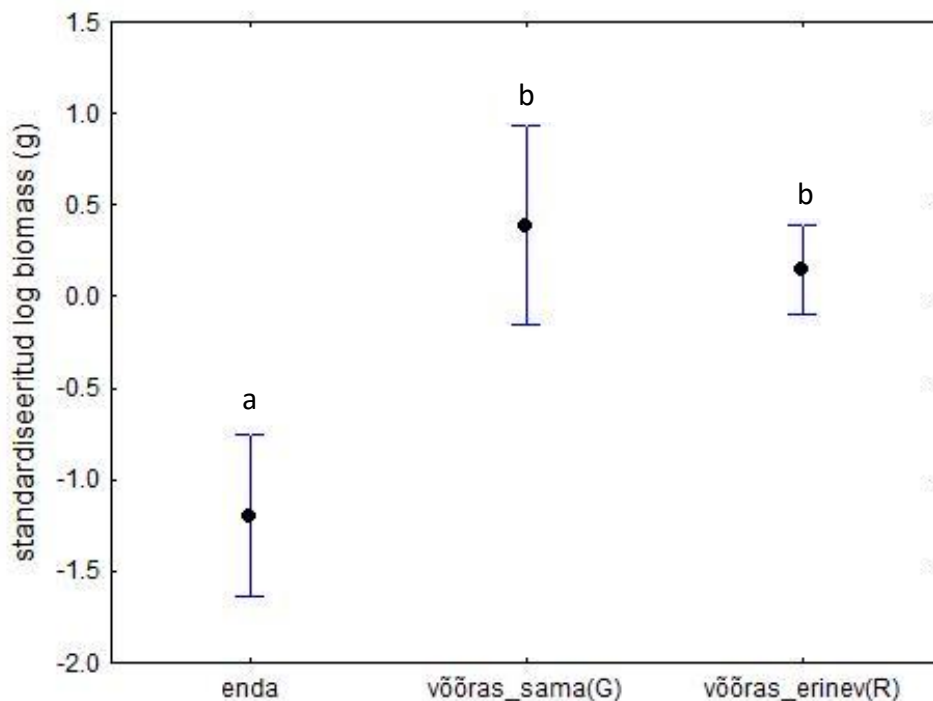
Katse II faasis omasid fikseeritud faktoritest taimede maapealsele biomassile olulist mõju MYC/noMYC töötlus ($F_{1,388}=23,1$; $P\leq 0,0001$), taimede kasvamine kas enda või võõra liigi poolt katse esimeses faasis konditsioneeritud mullal (enda/võõras) ja liigi kuuluvus samasse või erinevasse kasvuvormi (G/R) ($F_{2,388}=10,27$; $P\leq 0,0001$). Oluliseks tuli ka eelneva kahe fikseeritud tunnuse koosmõju taimede maapealsele biomassile ($F_{2,388}=4,04$; $P=0,0184$).

Erinevate töötluskombinatsioonide puhul leiti oluline erinevus biomasside vahel kui taimed kasvasid noMYC töötluses teisest kasvuvormist pärit liigi mullal võrreldes kasvuga enda liigi mullal ($P=0,0003$). Samuti erines oluliselt noMYC töötluses taimede kasv samast kasvuvormist pärit teise liigi ja enda liigi mulla vahel ($P=0,0124$). Statistiliselt oluline erinevus taimede biomasside vahel tekkis ka MYC töötluses, kui taimed kasvasid kas samast kasvuvormist liigi või enda liigi mullal ($P=0,0452$). Kasv enda liigi mullal erines oluliselt mükoriisatöötluste vahel ($P=0,0118$). Analüüsi erinevate kombinatsioonide tulemused on toodud tabelina töö lõpus (Lisa 1).

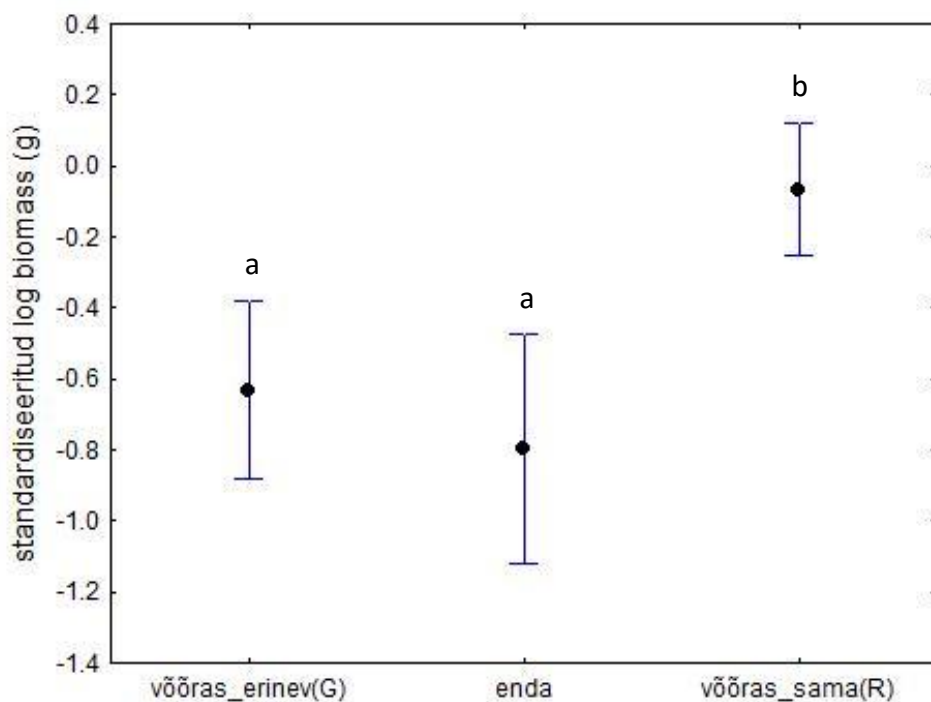
Et teada saada, milline oli mulla konditsioneeritud liikidel mõju tagasisides osalenud liikidele ja kas biomasside vahel oli oluline erinevus, tehti ühesuunaline-ANOVA test. Gruppide paremaks võrdluseks standardiseeriti eelnevalt kõikide liikide logaritmitud biomassid (Lisa 2). Tukey post-hoc testiga leiti, et MYC töötluses kasvasid rohundid kõige paremini võõra samast kasvuvormist liigi mullal, oluliselt ei erinenud rohundite kasv tagasisides enda liigi mullaga. AM seente olemasolul oli rohundite tagasiside negatiivsem teisest kasvuvormist pärit liikide mullal (Joonis 3). MYC töötluses oli graminoidide kasv suurim tagasisides sama kasvuvormiga teiste liikide mullal, oluliselt ei erinenud ka graminoidide kasv rohundite mullal. AM seente olemasolul kasvasid graminoidid kõige väiksema biomassiga enda liigi poolt varasemalt konditsioneeritud mullal (Joonis 4). Kui mullas puudus AM seen, siis kasvasid rohundid kõige paremini mullas, kus olid varem kasvanud teised rohundid. Oluliselt negatiivsem oli rohundite tagasiside kasvades graminoidide või enda liigi poolt varem konditsioneeritud mullal (Joonis 5). Graminoidid kasvasid AM seente puudumisel kõige suurema biomassiga tagasisides rohundite mullaga, oluliselt väiksem ei olnud ka graminoidide biomass kasvades teiste graminoidide mullal. Kõige väiksem biomass oli graminoididel kasvades enda liigi poolt konditsioneeritud mullal (Joonis 6). Joonistel on statistikutena märgitud keskväärts ja 95% usalduspiirid.



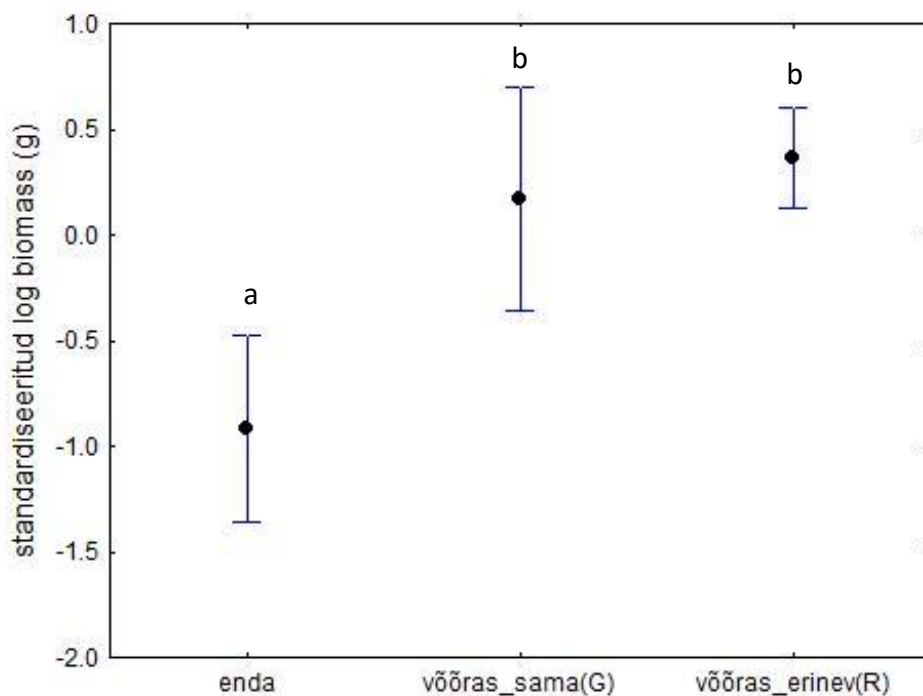
Joonis 3. MYC töötuse mõju rohundite standardiseeritud logaritmitud maapealsele biomassi keskmistele kasvades enda, teiste rohundite või graminoidide mullas. Erineva tähega märgitud keskmiste erinevus üksteisest on statistiliselt oluline ($P < 0,05$; Tukey test).



Joonis 4. MYC töötuse mõju graminoidide standardiseeritud logaritmitud maapealsele biomassi keskmistele kasvades enda, teiste graminoidide või rohundite mullas. Erineva tähega märgitud keskmiste erinevus üksteisest on statistiliselt oluline ($P < 0,05$; Tukey test).



Joonis 5. noMYC töötamise mõju rohundite standardiseeritud logaritmitud maapealsele biomassile keskmistele kasvades enda, teiste rohundite või graminodide poolt konditsioneeritud mullas. Erineva tähega märgitud keskmiste erinevus üksteisest on statistiliselt oluline ($P < 0,05$; Tukey test).



Joonis 6. noMYC töötamise mõju graminoidide standardiseeritud logaritmitud maapealsele biomassile keskmistele kasvades enda, teiste graminoidide või rohundite poolt konditsioneeritud mullas. Erineva tähega märgitud keskmiste erinevus üksteisest on statistiliselt oluline ($P < 0,05$; Tukey test).

4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli uurida AM seente rolli taimede ja mullamikroobide vahelises tagasisides. Looduslikus koosluses on potentsiaalselt olemas kõik kooslusele omased mikroorganismid, nende ajaline ja ruumiline heterogeensus on seotud taimeliikide varieeruvusega, kuna taimed mõjutavad oma risosfääri mikroobikooslust (Bever et al. 1997). Samas avaldavad mullamikroobid erinevate taimeliikide kasvule erinevat mõju (Kardol et al. 2007). Koosluses kasvavate taimede ja mullamikroobide vahelise tagasiside erinevuse tõttu võib muutuda isendite vaheline konkurents. Seega on põhjust arvata, et taimede ja mullamikroobide vahelisel tagasisidel on mõju taimekoosluse funktsioneerimisele (Brandt et al. 2013; Hartnett et al. 1993; Reynolds et al. 2003).

Uurimistöös püüdsime selgitada, kuidas mõjutab eelkõige AM seente olemasolu või puudumine looduslikus mikroobikoosluses vastavast kooslusest pärinevate erinevate taimeliikide tagasisidevastuseid. Taimede tagasiside on liigiti väga varieeruv ja seega oli katses oluline kasutada erineva kasvuvormiga liike. On leitud, et kui võrrelda tagasisidet mullamikroobidega kasvuvormide või funktsionaalsete rühmade kaupa, on seos tugevam, kui võrrelda tagasiside erinevust konkreetsete liikide põhjal (Bezemer et al. 2006). Katse esimeses faasis uuriti, kuidas mõjutab AM seente olemasolu mullas erinevaid taimeliike ja nende biomasse. Võrdlusena kasvasime liike samast kooslusest pärit mikroobidega, kas ilma või koos AM seentega (noMYC/MYC töötlused).

Juurte AM kolonisatsiooni analüüsi tulemustest selgus, et MYC töötluses oli AM seente kolonisatsioon olemas kõikidel taimeliikidel. Graminoidide *Briza media* ja *Festuca rubra* puhul on ka varasemalt näidatud AM seente kolonisatsiooni (Tawaraya 2003). *Carex flacca* puhul on kolonisatsioon kaheldav, kuigi leiti vähene hüüfide olemasolu ühes juurepreparaadis. Tegu võis siiski olla mõne teise endofüütse seene poolt tekitatud struktuuriga, mis sarnanesid AM hüüfidele. Samuti pole teadaolevatele andmetele tuginedes ka varasemalt liigil *C. flacca* AM kolonisatsiooni leitud ning liiki peetakse mittemükoriisseks. Siiski on perekonna *Carex* teistel esindajatel AM kolonisatsiooni tuvastatud (Miller et al. 1999). Kuna katse noMYC töötlustes puudus AM kolonisatsioon, siis võib antud andmete põhjal väita, et töötluste vaheline biomasside erinevus on seotud AM seente olemasoluga mullas. Taimede koloniseeritus AM seentega ei tähenda aga, et taime kasv mükoriisest suhtest paraneks.

Esimese katse faasi tulemuste põhjal saame väita, et on olemas seos taimede kasvuvormi ja taimede mükoriissuse vahel – rohundid saavad üldiselt AM suhtest rohkem kasu, seevastu kasvavad graminoidid paremini ilma AM kolonisatsioonita. Rohundite kasu suhtest AM seentega võib tuleneda sellest, et AM parandab taimede eluks vajalike toitainete omastamist, samuti kaitseb AM taimi patogeenide eest (Newsham et al. 1995). Töötluse noMYC mulla negatiivne mõju rohundite biomassile viitab negatiivsele taim-muld tagasisidele, mis võib olla tekitatud noMYC mullas olnud patogeenide poolt (Klironomos 2002; van der Putten 2003). Samuti polnud noMYC töötluses kasvanud rohunditel toitainete omastamiseks vajalikku tuge AM seente poolt. Kuna graminoidid on võimelised ka keskkonnast mükoriisa abita endale vajalike toitaineteid ammutama, võib AM kolonisatsioon juurtes tekitada taimetele biotilist stressi. Kasvades koos ülejäänud väiksemate mikroorganismidega, on graminoid võimeline kasvatama suuremat biomassi, kui kasvades lisaks ülejäänud mikroorganismidele ka koos AM seentega.

Katse teine faas keskendus mulla ja taimede vahelisele tagasisidele. Sooviti teada saada, kas taimede kasvus tekib erinevus kui taimed kasvavad mullal, kus liik on ise varasemalt kasvanud ja seega mulda konditsioneerinud, võrreldes mullaga, mida on konditsioneerinud teine kooslusest pärit taimeliik. Samuti uuriti mulda konditsioneerinud liigi kasvuvormi seost tagasisidega. Looduslikus olukorras kasvavad katsesse valitud liigid suure tõenäosusega läbisegi nii enda, kui ka teiste samast kooslusest pärit taimeliikide mullal. Selle tõttu eeldame, et tagasiside erinevate taimeliikide poolt kujundatud mullal on erinev ning on seotud liikide mükoriissusega.

Katse II faasi MYC töötlusega mullas, kus olid olemas kooslusele omased AM seened, kasvasid suurima biomassiga rohundid mullal, kus katse I faasis olid kasvanud teist liiki rohundid (Joonis 3). Mitte oluliselt väiksem oli rohundite biomass kasvades enda liigi mullal, kuid see varieerus liigiti rohkem. Rohunditel on positiivsem tagasiside kasvades rohundite mullal, arvatavasti seetõttu, et tagasisides osalevad taimed on tugevamalt mükoriissed. Rohundite poolt konditsioneeritud mulda jääb suuremal hulgal sobilikke AM seente osiseid, mis tagasisidena suurendavad AM suhtest positiivselt sõltuvate rohundite edukust.

Graminoidide biomass kasvades koos AM seentega (MYC) töötluses ja oli suurim sama kasvuvormiga võõra liigi mullal, ehk mullal, kus olid varem kasvanud teised graminoidid (Joonis 4). Graminoidide biomassid MYC töötluses ei olnud oluliselt erinevad kasvades teiste

graminoidide või rohundite mullas. Tulemused vastavad töös püstitatud hüpoteesile, kus oletasime, et vähemükoriissed liigid kasvavad AM seente olemasolul kõige paremini mullas, kus on varem kasvanud teised vähemükoriissed liigid. Samas oletasime, et vähemükoriissed liigid kasvavad kõige halvemini tugevalt mükoriisete liikide mullal, kuid katse tulemustes selgus, et graminoididel oli negatiivne tagasiside enda mullaga. Vähemükoriisete liikide negatiivne tagasiside enda mullaga võib olla seotud liigispetsiifiliste patogeenide ning AM seente poolt tekitatud biotilise stressi koosmõjuga. Ka varasemalt on näidatud tulemusi, kus vähemükoriissed kõrrelised kasvatasid suuremat biomassi tagasisides rohundite poolt konditsioneeritud mullal, kuid samas kasvasid kõrrelised halvemini teiste kõrreliste poolt konditsioneeritud mullal (Bezemer et al. 2006).

Mükoriisata (noMYC) töötluses olid nii rohundid (Joonis 5) kui graminoidid (Joonis 6) väikseima biomassiga kasvades enda liigi poolt konditsioneeritud mullal. Graminoidide biomass kasvades AM seenteta enda mullal oli võrreldes teiste töötlustega oluliselt väiksem, samas kui rohundite kasv enda mullal kasvades ilma AM seenteta oli oluliselt väiksem, kui kasv teiste rohundite mullal. Töö alguses püstitatud hüpotees sai seega kinnitust. AM seente puudumisel mullas kasvavad kõik liigid paremini teiste liikide muldadel, võrreldes kasvuga enda liigi mullal. Negatiivne tagasiside enda mullal kasvades võib tuleneda liigispetsiifiliste patogeenide akumulierumisest ja tugevalt mükoriisete liikide puhul patogeenidega võitlemiseks AM seente toetava mõju puudumisest (Newsham et al. 1995). AM seentel on seega toetav mõju eelkäijate patogeenide mahasurumisel.

Biomasside suurused ja tagasiside seosed erinevate töötlustega olid küll selgelt erinevad kasvuvormide lõikes, kuid varieerusid ka liigiti kasvuvormide sees (Lisa 3, Lisa 4). Liike eraldi vaadates ilmneb, et katse I faasis osutusid kõige tugevamalt AM sõltuvaks liikideks rohundite seast *Carlina vulgaris* ja *Pimpinella saxifraga* (Tabel 3). Katse II faasi tulemustes oli samuti näha, et liigi *C. vulgaris* biomass MYC töötluses oli suurim kasvades mullas, kus oli varem kasvanud tugevalt mükoriisne liik *P. saxifraga*. Samas võis liigi *C. vulgaris* tagasiside *P. saxifraga* mullaga olla seotud *P. saxifraga* suhteliselt väikestest taimeisenditest ja ilmselt seega kasvades ei võtnud mullast ära ka palju toitaineid. Samuti osutusid *C. vulgaris* biomassid suureks kasvades enda liigi mullas. See kinnitab esimest hüpoteesi, mille kohaselt tugevalt mükoriissed liigid kasvavad AM seente olemasolul kõige paremini varem teiste tugevalt mükoriisete liikide poolt konditsioneeritud mullas. Samas taime kasvu mõjutav suhe AM

seenpartneriga sõltub tihti spetsiifilise sobivusega taime ja AM seente liikidest (Bezemer et al. 2006). Seega võivad tugevalt mükoriissed liigid *C. vulgaris* ja *P. saxifraga* olla sümbioosis sarnaste AM seenpartneritega.

Tugevalt mükoriisse liigi *Carlina vulgaris* MYC töötluuse biomassid olid väiksemad kasvades liikide *Silene vulgaris* ja *Festuca rubra* mullal, samas kui tegelikkuses oli *Galium verum* katse I faasi tulemuste põhjal katses olnud liikidest AM seente olemasolust mullas kõige rohkem kannatav liik (Tabel 1). Taimeliikide tagasiside *Silene vulgaris*'e mullal ei pruugi olla seotud mükoriisa olemasoluga, kuigi liigil *S. vulgaris* esines katse I faasis AM seente kolonisatsioon (Tabel 1) ning liik kasvas AM seentega suuremaks, kui ilma AM abita (Tabel 3). *Silene* spp. puhul on näidatud juureeritiste inhibeerivat mõju teiste taimede kasvule (Murad et al. 2016), seega võib negatiivne tagasiside liigi *Silene vulgaris* mullal kasvades tuleneda hoopis juureeritiste pärssivast mõjust taimekasvule. Eraldi märkimist ja analüüsimist vääriksid kõik katses kasvatatud liigid, kuna kõikidel liikidel oli katse I faasi tulemuste põhjal näha veidi erinev mükoriissusest sõltuvus ning samuti ka tagasiside katse II faasis varieerus liigiti (Lisa 1, Lisa 2).

Antud uurimistöö näitab, et AM seente olemasolu muudab erineva mükoriissusega taimeliikide ja mulla vahelist tagasisidet. Töös saadud tulemused annavad kinnitust, et AM seentel on oluline roll taimede ja mulla vahelises tagasisides. Võime järeldada, et AM seentel on seega ka oluline roll taimekoosluste funktsioneerimises, muutes taimede vahelist konkurentsi tagasiside kaudu. Saadud tulemused näitavad AM seente üldist mõju tagasisides, kuid selle põhjal ei ole võimalik mikroobse tagasiside mehhanismide kohta midagi täpsemat järeldada. Täpsemate järelduste tegemiseks on vajalikud edasised uuringud, kus tehakse mulla koostise analüüsid nii katse I kui ka II faasi mullaproovide põhjal, et välja selgitada täpsemad mulla mikroobikooslused ja abiootilised mullaomadused. Lisaks oleks vajalik juureeritiste analüüs, mis annaks parema ülevaate taimedepoolsest rollist tagasisides.

Kokkuvõte

Looduslikus olukorras toimub taimede ja mullamikroobide vahel tagasiside, mis mõjutab omakorda koosluste funktsioneerimist. Töö peamiseks eesmärgiks oli uurida arbuskulaarmükoriisete (AM) seente rolli taimede ja mulla vahelise tagasiside kujundamises. Oletati, et AM seente olemasolul kasvavad mükoriisast tugevamalt sõltuvad liigid paremini teiste tugevalt mükoriisete liikide mullal, samas kui vähemükoriissed liigid kasvavad paremini vähemükoriisete liikide mullal. AM seente puudumisel kasvavad kõik liigid paremini teiste liikide mullal, võrreldes tagasisidega enda liigi mullal. Töös püstitatud hüpoteeside tõestamiseks viidi läbi kaheosaline taime ja mulla vahelise tagasiside katse. Katses kasutati Uisu loopealset ja Laelatu puisniidult korjatud taimeseemneid, katseks valiti taimeliike nii rohundite kui graminoidide seast.

Katse I faasis uuriti katsesse valitud liikide mükoriisust, samuti oli katse I faas mulla ettevalmistus katse II faasi jaoks. Taimi kasvatati kooslusele omaste mikroobidega, koos või ilma vastavale kooslusele omaste AM seenteta. Katse esimeses faasis oli töötlusel oluline mõju taimede biomassile. Tulemuste põhjal võib järeldada, et rohundid on üldiselt AM seentest rohkem sõltuvad kui graminoidid. Katse II faasis uuriti AM seente olemasolu või puudumise mõju liikide tagasisides, kasvatades liike koos enda ja teiste samast kooslusest pärit liikide poolt konditsioneeritud mulla inokulaadiga.

Katses tulemustes selgus, et: 1) tugevalt mükoriisast sõltuvad taimeliikidel on mükoriisaseente olemasolul mullas kõige positiivsem tagasiside teiste tugevalt mükoriisete liikide mullal, seejärel oma mullal ja kõige negatiivsem vähemükoriisete liikide mullal; 2) mükoriisast vähem sõltuvatel liikidel on tagasiside mükoriisaseente olemasolul mullas kõige positiivsem teiste vähemükoriisete liikide mullal, seejärel tugevalt mükoriisete liikide mullal, ning kõige negatiivsem enda mullal; 3) kui mullas puudub mükoriisaseen, siis kasvavad kõik liigid paremini teiste liikide mullal, olenemata nende mükoriisest sõltuvusest. Töö tulemused kinnitavad, et AM seentel on oluline roll taimede ja mulla vahelises tagasisides, muutes mükoriisast erineval määral sõltuvate liikide tagasisidet erinevalt.

Summary

The role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant-soil feedback

The aim of the current study was to determine the role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in plant-soil feedback. To determine that, greenhouse experiment was made. Seeds of 10 different graminoids and forbs from Western Estonia from Uisu alvar and Laelatu meadow were used. We suggested three hypotheses: in the presence of AM fungi in soil microbial community, 1) highly mycorrhizal plants have the most positive feedback in soil of other highly mycorrhizal plants, while 2) plants less dependent on mycorrhizal have the most positive feedback in soil of other less mycorrhizal plants; 3) in the absence of AM fungi in soil microbial community all plants show the most negative feedback in their own soil.

Experiment consisted of two parts. In the first part, we investigated mycorrhizal status of all the plant species. Seedlings were planted in two different treatments. At first, sterilised soil was inoculated with soil microbes that were harvested from original plant communities. The role of arbuscular mycorrhiza was studied by inoculating plant pots with sterilized (noMYC treatment) or non-sterilized (MYC treatment) soil. Plant pots were placed in a random position on the greenhouse benches. Plants were grown for 8 weeks, and after that the plants were harvested. Plants' biomass was determined after drying. The AM fungal colonization was determined in both treatments. The degree of plant growth change associated with AM colonization was expressed as relative mycorrhizal dependency (RMD). We detected that forbs and graminoids reacted differently to MYC and noMYC treatments. The results of the study showed that forbs rely heavily on arbuscular mycorrhizal symbiosis, while graminoids are less dependent on the AM symbiosis.

The soil from the first experiment was used in the second experiment to assess the plant-soil feedback effects on different plant species. All the plants were grown in their own soil and soils of four other plant species in MYC and noMYC treatments. Plants were grown for 8 weeks as in the first experiment, and then harvested. Plant shoot weight was determined after drying. We determined feedback effects of these soils to plants of the same or different species. Feedback effects were analysed at the level of plant taxonomic groups (graminoids and forbs).

The effect of AM fungi on species' soil feedback varied, depending on the species' mycorrhizal status. The addition of AM fungi had a supportive effect on forbs, which had to cope with predecessors' pathogens. Forb species had the most positive feedback growing in the soil of other forb species. In this matter, predecessors had positive effect towards the AM fungi in soil and forbs benefitted from it. Graminoids soil caused the most negative feedback on forbs. On the other hand, graminoids had the most positive feedback with other graminoid species' soil and the most negative feedback while growing on their own soil. Negative feedback of graminoids in their own soil can exist due to the biotic stress combined by species-specific pathogens and presence of AM fungi.

In the absence of AM fungi from the soil, both forbs and graminoids experienced the most negative feedback on their own soil. As there was no AM fungi in the noMYC treatment, it could mean that highly mycorrhizal plants experienced more stress. Feedback with their own soil was the most negative due to the accumulation of species-specific pathogens.

Based on results of the study we can conclude that AM fungi play an important role in interactions between plants and soil. The presence of AM fungi can make a difference in plant and soil microbial feedback as it confers protection against root pathogens to highly mycorrhizal dependent host plants.

Tänuõnad

Täna oma juhendajaid Sirgi Saart ja Marina Semchenkot nõuannete, pühendumuse ja igakülgse abi eest. Samuti täna erinevates töötappides abiks olnud Teele Jairust, Maarja Öpikut ja Jaan Liirat. Lisaks täna kõiki praeguseid ja endiseid tööühma liikmeid ning abilisi, kes aitasid kaasa katsete õnnestumisel ja olid toeks käesoleva töö valmimisel.

Kasutatud kirjandus

- Adl, M. S. & Gupta, V. V. S. R. 2006. Protists in Soil Ecology and Forest Nutrient Cycling. *Canadian Journal of Forest Research* 36(7):1805–17.
- Baxendale, C., Orwin, K. H., Poly, F., Pommier, T. & Bardgett R. D. 2014. Are Plant-Soil Feedback Responses Explained by Plant Traits? *The New phytologist* 204:408–23.
- Begon, M., Townsend C. R. & Harper J. L. 2005. Ecology: From Individuals to Ecosystems (4th Edition). *Wiley-Blackwell*.
- Benot, M. L., Bittebiere, A. K, Ernoult, A., Clément, B. and Mony, C. 2013. Fine-Scale Spatial Patterns in Grassland Communities Depend on Species Clonal Dispersal Ability and Interactions with Neighbours. *Journal of Ecology* 101:626–36.
- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A. & Smalla, K. 2002. Plant-Dependent Genotypic and Phenotypic Diversity of Antagonistic Rhizobacteria Isolated from Different Verticillium Host Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68(7):3328–38.
- Bezemer, T. M. Lawson, C. S., Hedlund, K., Edwards, A. R., Brook, A. J., Igual, J. M., Mortimer, S. R. & van der Putten, W. H. 2006. Plant Species and Functional Group Effects on Abiotic and Microbial Soil Properties and Plant-Soil Feedback Responses in Two Grasslands. *Journal of Ecology* 94:893–904.
- Bever, J. D. 2003. Soil Community Feedback and the Coexistence of Competitors: Conceptual Frameworks and Empirical Tests. *New Phytologist* 157(3):465–73.
- Bever, J. D. Dickie, I. A., Facelli, E., Facelli, J. M., Klironomos, J., Moora, M., Rillig, M. C., Stock, W. D, Tibbett, M. & Zobel, M. 2010. Rooting Theories of Plant Community Ecology in Microbial Interactions. *Trends in ecology & evolution* 25(8):468–78.
- Bever, J. D., Westover, K. M. & Antonovics, J. 1997. Incorporating the Soil Community into Plant Population Dynamics: The Utility of the Feedback Approach. *Journal of Ecology* 85(5):561–73.
- Brandt, A. J., de Kroon, H., Reynolds, H. L. & Burns, J. H. 2013. Soil Heterogeneity Generated by Plant-Soil Feedbacks Has Implications for Species Recruitment and Coexistence edited by W. van der Putten. *Journal of Ecology* 101(2):277–86.
- Broeckling, C. D., Broz, A. K., Bergelson, J., Manter, D. K. & Vivanco, J. M. 2008. Root Exudates Regulate Soil Fungal Community Composition and Diversity. *Applied and environmental microbiology* 74(3):738–44.
- Buée, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L. & Jurkevitch, E. 2009. The Rhizosphere Zoo: An Overview of Plant-Associated Communities of Microorganisms, Including Phages, Bacteria, Archaea, and Fungi, and of Some of Their Structuring Factors. *Plant and Soil* 321(1-2):189–212.
- Börstler, B., Renker, C., Kahmen, A. & Buscot, F. 2006. Species Composition of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Two Mountain Meadows with Differing Management Types and Levels of Plant Biodiversity. *Biology and Fertility of Soils* 42(4):286–98.

- Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L. & Brüssow, H. 2003. Phage as Agents of Lateral Gene Transfer. *Current opinion in microbiology* 6(4):417–24.
- Casper, B. B. & Castelli, J. P. 2007. Evaluating Plant-Soil Feedback Together with Competition in a Serpentine Grassland. *Ecology Letters* 10:394–400.
- Chen, X.-P., Zhu, Y.-G., Xia, Y., Shen, J.-P., & He, J.-Z. 2008. Ammonia-Oxidizing Archaea: Important Players in Paddy Rhizosphere Soil? *Environmental microbiology* 10(8):1978–87.
- Dostalek, T., Pankova, H., Münzbergova, Z. & Rydlova, J. 2013. The Effect of AMF Suppression on Plant Species Composition in a Nutrient-Poor Dry Grassland. *PLoS ONE* 8(11):1–11.
- Grace, J. B. & Tilman, D. 1992. Perspectives on Plant Competition. *Vegetatio* 103(2):176–78.
- Harley, J. L. & Harley, E. L. 1987. A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora. *New Phytologist* 105(s1):1–102.
- Harrison, K. A. & Bardgett, R. D. 2010. Influence of Plant Species and Soil Conditions on Plant-Soil Feedback in Mixed Grassland Communities. *Journal of Ecology* 98(2):384–95.
- Hartnett, D. C., Hetrick, B. A. D., Wilson, G. W. T. & Gibson, D. J. 1993. Mycorrhizal Influence on Intra- and Interspecific Neighbour Interactions among Co-Occurring Prairie Grasses. *Journal of Ecology* 81(4):787–95.
- van der Heijden, M. G. A., Streitwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, K., Boller, T., Wiemken, A. & Sanders, I. R. 2006. The Mycorrhizal Contribution to Plant Productivity, Plant Nutrition and Soil Structure in Experimental Grassland. *New Phytologist* 172(4):739–52.
- van der Heijden, M. G. A., Wiemken, A. & Sanders, I. R. 2003. Different Arbuscular Mycorrhizal Fungi Alter Coexistence and Resource Distribution between Co-Occurring Plant. *New Phytologist* 157(3):569–78.
- Heinemeyer, A. & Fitter, A. H. 2004. Impact of Temperature on the Arbuscular Mycorrhizal (AM) Symbiosis: Growth Responses of the Host Plant and Its AM Fungal Partner. *Journal of Experimental Botany* 55(396):525–34.
- de Jong, T. J., Klinkhamer, P. G. L. & de Heiden, J. L. H. 1995. The Effect of Water and Mycorrhizal Infection on the Distribution of *Carlina Vulgaris* on Sand Dunes on JSTOR. *Ecography* 18(4):384–89.
- Kardol, P., Cornips, N. J., van Kempen, M. M. L., Bakx-Schotman, J. M. T. & van der Putten, W. H. 2007. Microbe-Mediated Plant–Soil Feedback Causes Historical Contingency Effects in Plant Community Assembly. *Ecological Monographs* 77(2)(2):147–62.
- Klironomos, J. N. 2002. Feedback with Soil Biota Contributes to Plant Rarity and Invasiveness in Communities. *Nature* 417(6884):67–70.
- Koske, R. E. & Gemma, J. N. 1989. A Modified Procedure for Standing Roots to Detect VA Mycorrhizas. 486–505.
- Kull, K. & Zobel, M. 1991. High Species Richness in an Estonian Wooded Meadow. *Journal of Vegetation Science* 2(5):715–18.

- Leht, M. (toimetaja). 2007. Eesti Taimede Määraja. *Eesti Loodusfoto, Tartu*.
- Leininger, S. Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C. & Schleper, C. 2006. Archaea Predominate among Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in Soils. *Nature* 442(7104):806–9.
- Lepik, A., Abakumova, M., Zobel, K. & Semchenko, M. 2012. Kin Recognition Is Density-Dependent and Uncommon among Temperate Grassland Plants. *Functional Ecology* 26(5):1214–20.
- MacDougall, A. S., Gilbert, B. & Levine, J. M. 2009. Plant Invasions and the Niche. *Journal of Ecology* 97:609–15.
- 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(3):495–501.
- Miki, T. 2012. Microbe-Mediated Plant–soil Feedback and Its Roles in a Changing World. *Ecological Research* 27(3):509–20.
- Miller, R. M., Smith, C. I., Jastrow, J. D. & Bever, J. D. 1999. Mycorrhizal Status of the Genus *Carex* (Cyperaceae). 86(4):547–53.
- Murad, W., Ullah, R., Ullah, A., Khan, M. G. R., ur Rehman, H., Zulqarnain & Khan, Z. U. 2016. Allelopathic Effect of *Silene villosa* on Germination and Seedling Growth of *Triticum aestivum* L. *Journal of Pharmacy Research* 10(4):176–80.
- Newsham, K. K., Fitter, A. H. & Watkinson, A. R. 1995. Arbuscular Mycorrhiza Protect an Annual Grass from Root Pathogenic Fungi in the Field. *Journal of Ecology* 83(6):991–1000.
- Niiyama, K. 1990. The Role of Seed Dispersal and Seedling Traits in Colonization and Coexistence of *Salix* species in a Seasonally Flooded Habitat. *Ecological Research* 5(3): 317–331.
- Orwin, Kate H. et al. 2010. Linkages of Plant Traits to Soil Properties and the Functioning of Temperate Grassland. *Journal of Ecology* 98(5):1074–83.
- Paal, J. 1997. Eesti Taimkatte Kasvukohatüüpide Klassifikatsioon. *Tartu Ülikooli Botaanika ja Ökoloogia Instituut* Tallinn.
- Pawlowska, T. E., Blaszkowski, J. & Ruhling, A. 1996. The Mycorrhizal Status of Plants Colonizing a Calamine Spoil Mound in Southern Poland. *Mycorrhiza* 6(6):499–505.
- Pregitzer, C. C., Bailey, J. K., Hart, S. C. & Schweitzer, J. A. 2010. Soils as Agents of Selection: Feedbacks between Plants and Soils Alter Seedling Survival and Performance. *Evolutionary Ecology* 24(5):1045–59.
- Van der Putten, W. H., van Dijk, C. & Peters, B. A. M. 1993. Plant-Specific Soil-Borne Diseases Contribute to Succession in Foredune Vegetation. *Nature* 362(6415):53–56.
- Van der Putten, W. H. 2003. Plant Defense Belowground and Spatiotemporal Processes in Natural Vegetation. *Ecology* 84(9):2269–80.
- Van der Putten, W. H., Bardgett, R. D., Bever, J. D., Bezemer, T. M., Casper, B. B., Fukami, T., Kardol, P., Klironomos, J. N., Kulmatiski, A., Schweitzer, J. A., Suding, K. N., Van de Voorde,

- T. F. J. & Wardle, D. A. 2013. Plant-Soil Feedbacks: The Past, the Present and Future Challenges. *Journal of Ecology* 101(2):265–76.
- Reynolds, H. L., Packer, A., Bever, J. D. & Clay, K. 2003. Grassroots Ecology: Plant-Microbe-Soil Interactions as Drivers of Plant Community Structure and Dynamics. *Ecology* 84(9):2281–91.
- Semchenko, M., Abakumova, M., Lepik, A. & Zobel, K. 2013. Plants Are Least Suppressed by Their Frequent Neighbours: The Relationship between Competitive Ability and Spatial Aggregation Patterns. *Journal of Ecology* 101:1313–21.
- Sih, A., Crowley, P. Mcpeek, M., Petranka, J. & Strohmeier, K. 1995. Predation, Competition, and Prey Communities – a Review of Field Experiments. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:269–311.
- Smith, S. E. & Read, D. J. 2009. Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition). Amsterdam, the Netherlands: Academic Press.
- Šmilauerová, M., Lokvencová, M. & Šmilauer, P. 2012. Fertilization and forb:Graminoid Ratio Affect Arbuscular Mycorrhiza in Seedlings but Not Adult Plants of *Plantago Lanceolata*. *Plant and Soil* 351(1-2):309–24.
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I. & Pieterse, C. M. J. 2013. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* Spp. Bacteria. *Plant Physiology* 162(May):304–18.
- Tawaraya, K. 2003. Arbuscular Mycorrhizal Dependency of Different Plant Species and Cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition* 49(5):655–68.
- Öpik, M., Metsis, M., Daniell, T. J., Zobel M. & Moora, M. 2009. Large-Scale Parallel 454 Sequencing Reveals Host Ecological Group Specificity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in a Boreonemoral Forest Published by: Wiley on Behalf of the New Phytologist 184(2):424–37.
- Young, T., Cameron, D. D. & Phoenix, G. K. 2015. Using AMF Inoculum to Improve the Nutritional Status of *Prunella Vulgaris* Plants in Green Roof Substrate during Establishment. *Urban Forestry and Urban Greening* 14(4):959–67.

LISAD

Lisa 1. – Tabel katse II faas, erinevate töötlus kombinatsioonide vahelised erinevused.

Lisa 2. – Tabel katse II faas, noMYC ja MYC töötluste mõju rohundite ja graminoidide maapealsetele biomassidele.

Lisa 3. – Tulpdiagrammid katse II faasi graminoidide maapealse biomassi kohta.

Lisa 4. – Tulpdiagrammid katse II faasi rohundite maapealse biomassi kohta.

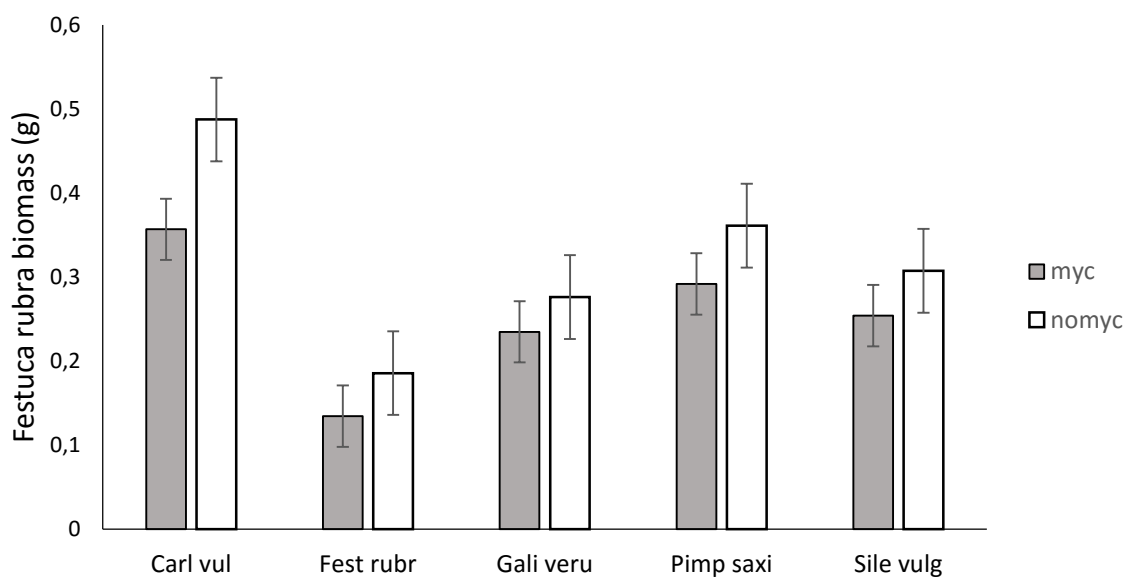
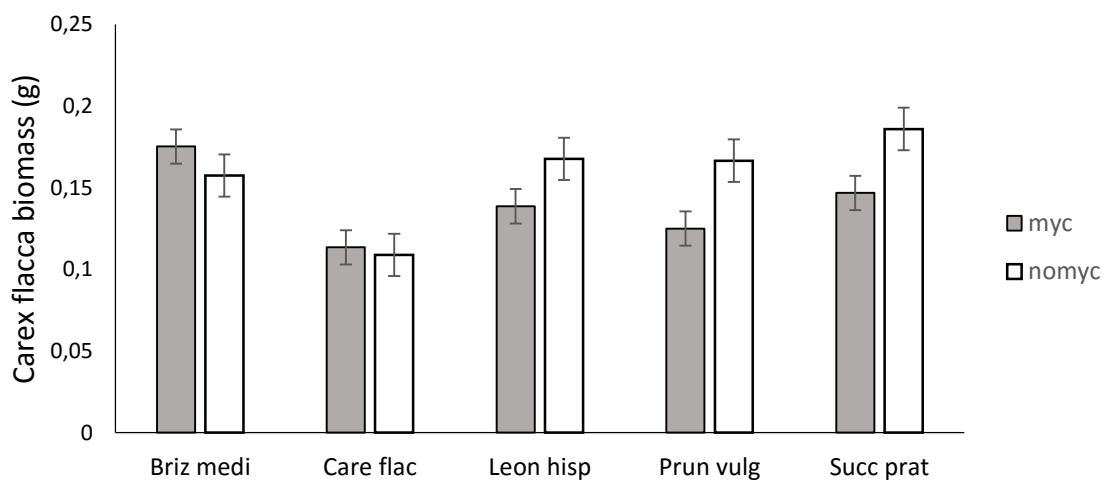
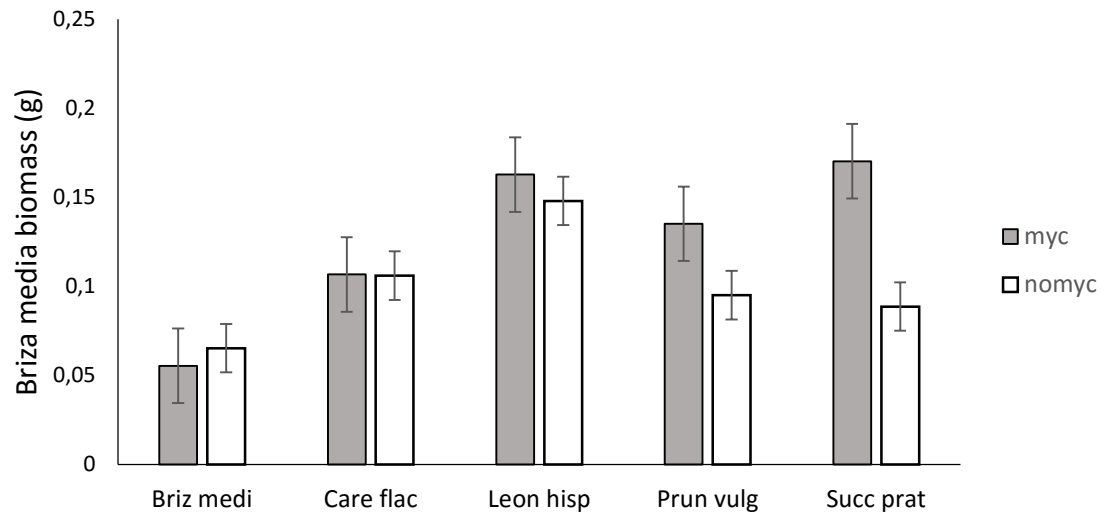
LISA 1. Tabel katse II faasi erinevate töötluspaaride vaheliste biomasside erinevuse kohta, ANOVA segamudel.

Effect	Töötlus (MYC/noMYC)	Liik_k.vorm	Töötlus (MYC/noMYC)	Liik_k.vorm	P
MYC/noMYC	MYC		noMYC		≤0,0001
Liik_kasvuvorm		võõra_ erinev		võõra_ sama	0,6912
Liik_kasvuvorm		võõra_ erinev		võõra_ sama	0,0004
Liik_kasvuvorm		võõra_ sama		enda	≤0,0001
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	võõra_ erinev	MYC	võõra_ sama	0,2274
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	võõra_ erinev	MYC	enda	0,8734
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	võõra_ erinev	noMYC	võõra_ erinev	0,9629
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	võõra_ erinev	noMYC	võõra_ sama	0,4576
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	võõra_ erinev	noMYC	enda	≤0,0001
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	võõra_ sama	MYC	enda	0,0452
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	võõra_ sama	noMYC	võõra_ erinev	0,0371
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	võõra_ sama	noMYC	võõra_ sama	0,0010
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	võõra_ sama	noMYC	enda	≤0,0001
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	enda	noMYC	võõra_ erinev	0,9975
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	enda	noMYC	võõra_ sama	0,9986
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	MYC	enda	noMYC	enda	0,0118
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	noMYC	võõra_ erinev	noMYC	võõra_ erinev	0,9067
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	noMYC	võõra_ erinev	noMYC	enda	0,0003
MYC/noMYC * Liik_kasvuvorm	noMYC	võõra_ erinev	noMYC	enda	0,0124

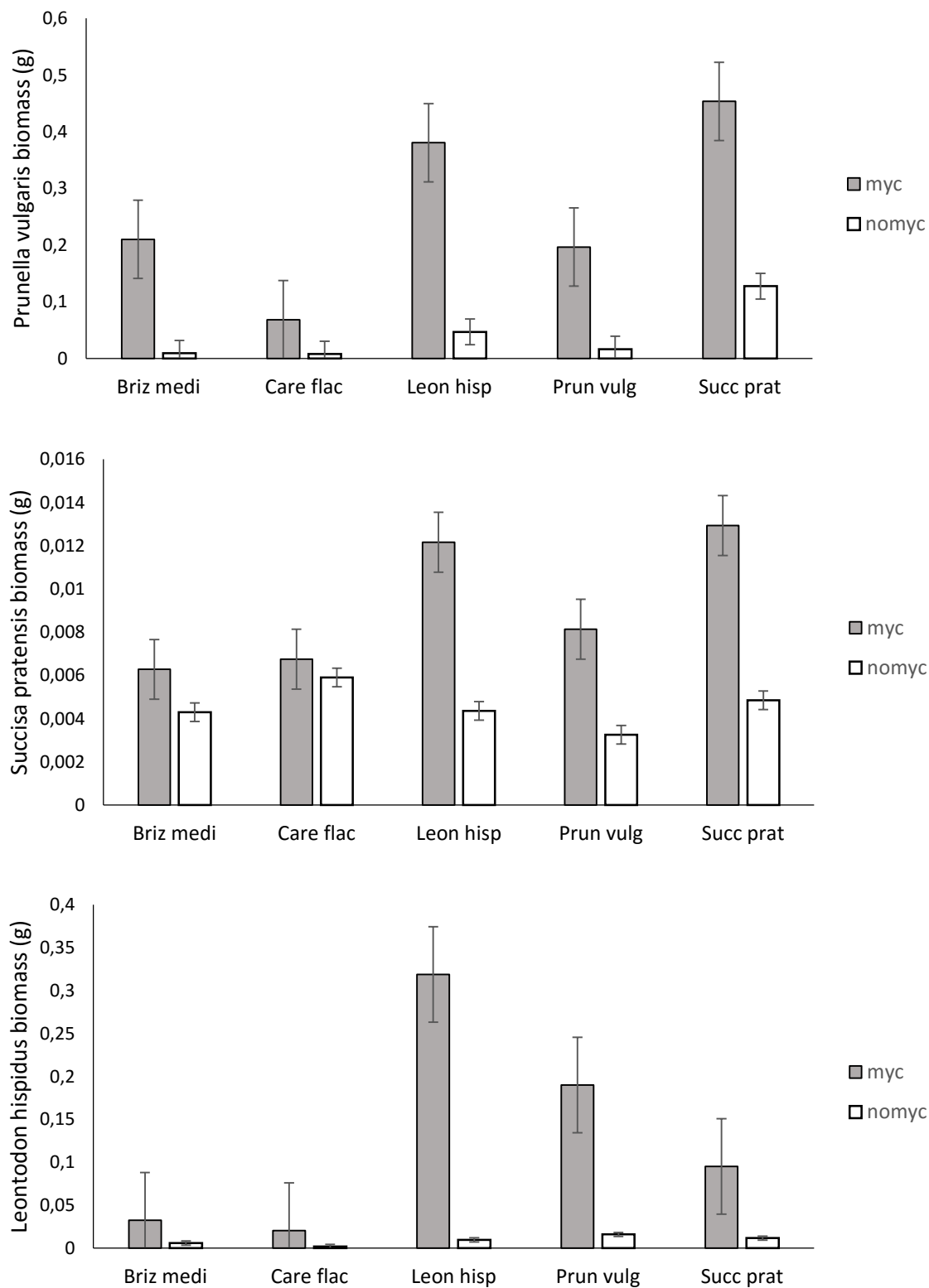
LISA 2. MYC ja noMYC töötluste mõju rohundite ja graminoidide maapealsele biomassile kasvades enda, teise sama kasvuvormiga või teise kasvuvormiga liigi poolt konditsioneeritud mullas. Tabelis on näidatud dispersioonanalüüsiga saadud vabadusastmete arv (Df), F statistikud ja nende statistiline olulisus (*P*).

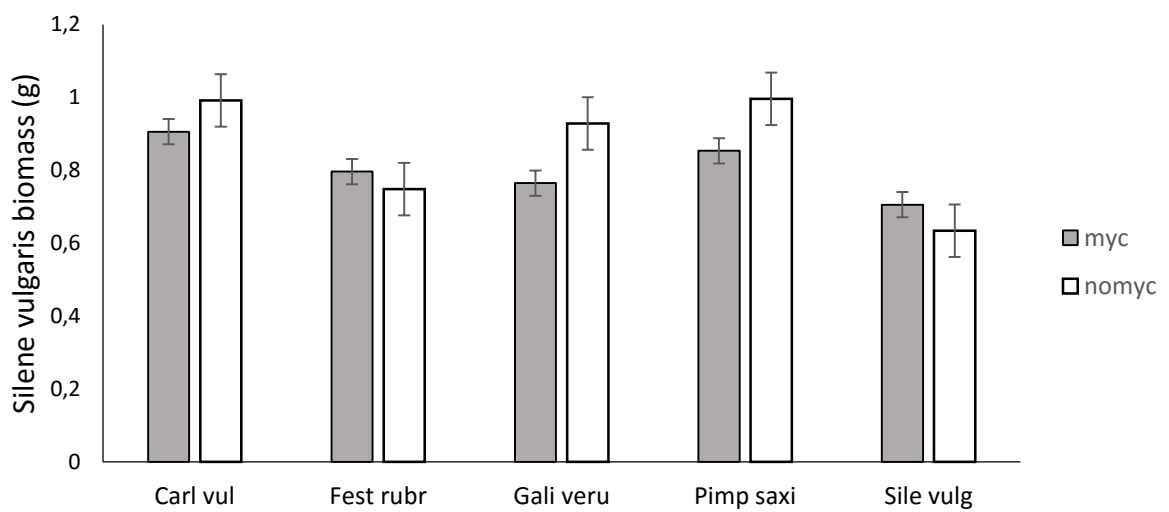
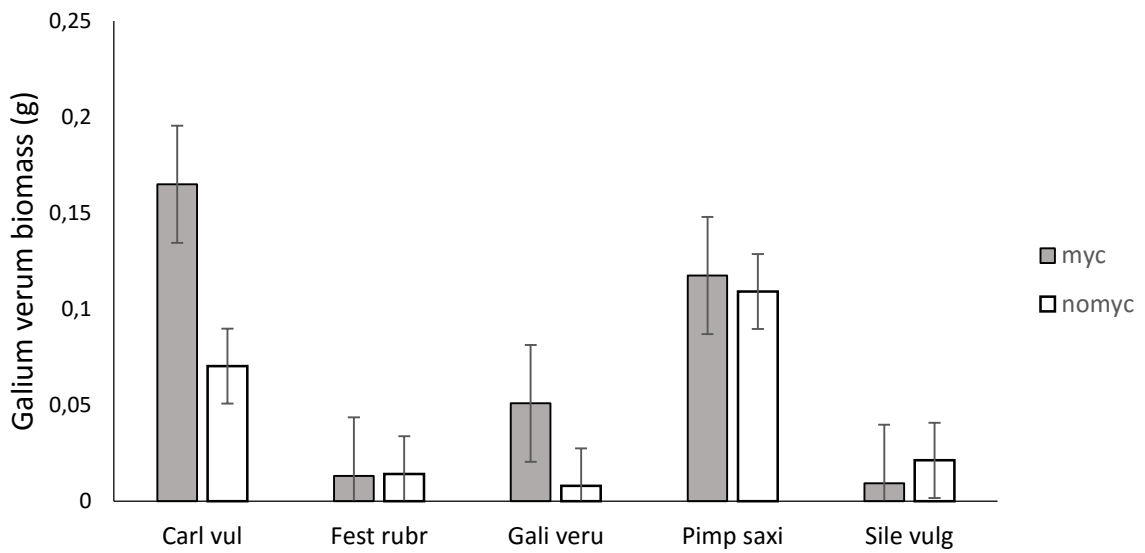
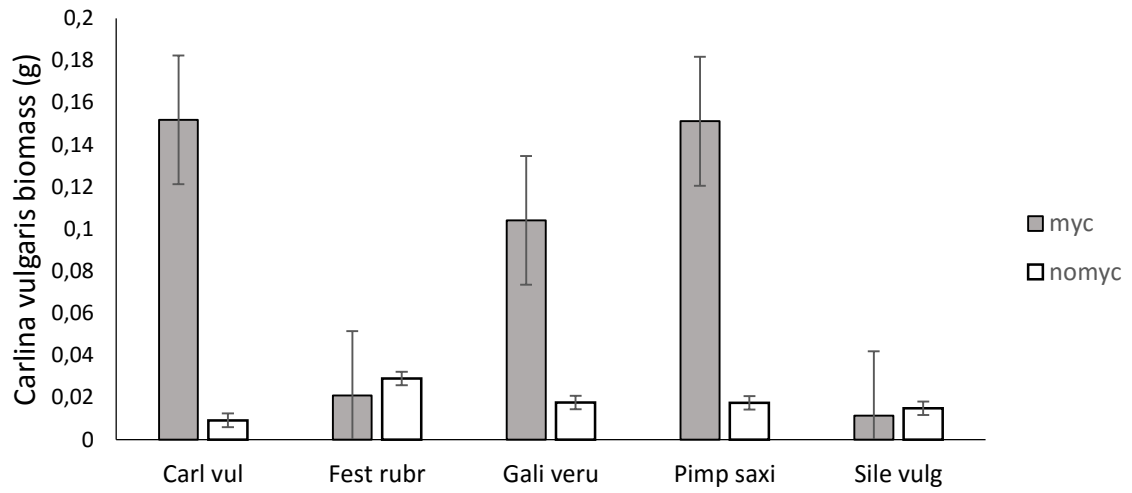
	ROHUNDID						GRAMINOIDID					
	MYC			noMYC			MYC			noMYC		
	Df	F	<i>P</i>	Df	F	<i>P</i>	Df	F	<i>P</i>	Df	F	<i>P</i>
Intercept	1	11,72	0,0008	1	43,74	≤0,0001	1	3,16	0,0799	1	1,06	0,3076
Enda/võõras_G/R	2	5,76	0,0040	2	10,82	≤0,0001	2	15,89	≤0,0001	2	12,95	≤0,0001
Jääk	130			122			70			70		

LISA 3. Tulpdiagrammidena on toodud katse II faasis kasvatatud graminoidide maapealne biomass, kasvades tagasisides erinevates tötlustes (MYC/noMYC) enda ja ülejäänud nelja samast kooslusest pärit liigi mullal. Vearibadega on tähistatud standard hälve.



LISA 4. Tulpdiagrammidena on toodud katse II faasis kasvatatud rohundite maapealne biomass, kasvades tagasisides erinevates tötlustes (MYC/noMYC) enda ja ülejäänud nelja samast kooslusest pärit liigi mullal. Vearibadega on tähistatud standard hälve.





Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Greete Horn**

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

Arbuskulaarmükoriisete seente roll taimede ja mulla vahelise tagasiside kujunemisel

mille juhendajad on **Sirgi Saar** ja **Marina Semchenko** ,

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, **20.05.2016**