

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
BOTAANIKA OSAKOND

**Arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimine juureproovides:
fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi ja juurte mikroskopeerimise
meetodite võrdlus**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Klaara Käämer

Juhendajad: PhD Inga Hiiesalu-Vahter

PhD Kaisa Anneli Torppa

PhD Jaak Truu

TARTU 2026

INFOLEHT

Arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimine juureproovides: fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi ja juurte mikroskopeerimise meetodite võrdlus

Mullaelustikus olulist rolli mängivate arbuskulaarset mükoriisat moodustavate krohmseente uurimisel kasutatakse sageli kvantitatiivseid meetodeid. Võrdlevaid analüüse on vaja, et teadustöös ja mullaseires kasutada optimaalseimat meetodit krohmseente rohkuse hindamiseks. Bakalaureusetöö eesmärgiks oli anda kirjanduse põhjal ülevaade seniste teadmiste kohta arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimises ning võrrelda juurte mikroskopeerimist ja fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi katseandmete põhjal. Leiti, et kahe meetodi vahel on positiivne statistiliselt oluline seos, mis ei olenenud katse asupaigast ega kasvatatud põllukultuurist. Siiski annavad meetodid komplementaarset, mitte identset informatsiooni: mikroskopeerimine sümbioosi olemuse ja rasvhapete analüüs biomassi kohta. Vastavalt katse spetsiifikale ja mahule soovitatakse kasutada fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi eraldi või kombineeritult mikroskopeerimisega.

Märksõnad: Arbuskulaarne mükoriisa, krohmseened, kvantifitseerimine, mikroskopeerimine, rasvhapete analüüs

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Quantification of arbuscular mycorrhiza in root samples: comparison of phospholipid fatty acid analysis and root microscopy

Quantitative methods are often used to study arbuscular mycorrhizal fungi, which are functionally important members of soil biota. It is important to use goal-appropriate methods to ensure high quality and interpretability of results. The aim of the bachelor's thesis was to consolidate existing knowledge on arbuscular mycorrhizal quantification and create a comparative experiment between root microscopy and phospholipid fatty acid analysis. It was found that there is a positive statistically significant relationship between the two methods, which did not depend on the location of the experiment or the cultivated crop. However, the methods provide complementary, not identical, information. Microscopy tells about the nature of the symbiosis and fatty acid analysis reflects fungal biomass. Depending on the specificity and scope of the experiment, it is recommended to use phospholipid fatty acid analysis separately or in combination with microscopy.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza, quantification, microscopy, fatty acid analysis

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Arbuskulaarse mükoriisa üldisloomustus	6
1.2. Krohmseente morfoloogia, taksonoomia ja liikide defineerimine.....	6
1.3. Krohmseente ökoloogia ja levik	9
1.4. Krohmseente olulisus ökosüsteemis ja põllumajanduses	10
1.5. Arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimine	12
1.5.1. Mikroskopeerimisel põhinevad meetodid.....	13
1.5.2. Rasvhapete analüüs	16
1.5.3. Molekulaarsed meetodid	17
2. UURIMUS.....	19
2.1. Töö eesmärgid	19
2.2. Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1. Andmed.....	19
2.2.2. Analüüsimeetodid	19
2.3. Tulemused	22
2.4. Arutelu	25
KOKKUVÕTE.....	30
SUMMARY.....	31
TÄNUSÕNAD.....	33
KIRJANDUSE LOETELU	34
LIHTLITSENTS	49

KASUTATUD LÜHENDID

AM – arbuskulaarne mükoriisa

ELFA – estriga seotud rasvhapped

ITS – sisemine transkribeeritav vahejärjestus

LSU – ribosoomi suur subühik

NLFA – neutraalsed rasvhapped

PLFA – fosfolipiidsed rasvhapped

SSU – ribosoomi väike subühik

qPCR – reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon

SISSEJUHATUS

Euroopa Liidu direktiividest tulenevalt on meil kohustus hoida loodust ja toita maailma suurenevat rahvastikku. Nimelt, Euroopa Roheleppe alusel tuleb 2050. aastaks vähendada väetiste ja pestitsiidide kasutamist, toitaine kadu mullast ja suurendada mahepõldude osakaalu põllumajanduses. Seega on vaja uusi lahendusi, mis vähendaksid sünteetilisi sisendeid, kuid tagaksid samaaegselt toiduturvalisuse. Nendele eesmärkidele võivad lahendust pakkuda mullaelustiku ühed olulisimad liikmed – arbuskulaarset mükoriisat moodustavad seened ehk krohmseened.

Krohmseened on levinud tervel planeedil ning moodustavad 80% maismaataimedega sümbiootilisi sidemeid (Smith ja Read, 2008). Selles vastastikku kasulikus kooselus annab taim seenele fotosünteesi käigus toodetud aineid ning saab vastu eluks vajalikke toitaineid, näiteks fosforit ja lämmastikku (Bago jt., 2000). Tänu sellele kasutavad taimed toitaineid tõhusamalt ja väetisi on vaja vähem. Lisaks tõstavad krohmseened taime põua- ja patogeenikindlust, parandavad mulla tervist ja tagavad selle struktuuri säilimise (Rillig jt., 2001; Wehner jt., 2010).

Krohmseente uurimiseks on vaja kvantitatiivseid andmeid, mis võimaldaks põllumajandusmuldadel krohmseente elurikkusega paremini arvestada. Kvantitatiivsed andmed annavad informatsiooni sümbioosi olemuse ja tugevuse kohta, lisaks annavad ka infot mulla tervise ja taime toitumise kohta (Abbott ja Lumley, 2014; Smith ja Read, 2008). Antud uuringus kasutati kõige levinumaid ja uuritumaid meetodeid: juurte mikroskopeerimist ja fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi.

Käesoleva bakalaureusetöö esimene eesmärk on kirjanduse põhjal anda ülevaade krohmseente morfoloogiast ja ökoloogiast ja nende kvantifitseerimise meetoditest ning tuua välja levinumate meetodite eeliseid ja puudusi. Teine eesmärk on katseandmete abil uurida kahe kvantifitseerimise meetodi, juurte mikroskopeerimise ja fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi, omavahelist suhet ja sobivust arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimiseks juureproovidest. Uuringuid mikroskopeerimise ja rasvhapete korrelatsiooni kohta juureproovidest leidub üksikuid, mistõttu pakub töö lisaväärtust arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimise meetodite uurimisse. Saadud katsetulemuste ja teoreetilise tausta baasil pakutakse soovitusi teadustööde läbiviijatele ning rakenduslikku väärtust mulla- ja taimetervise tegelevatele asutustele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Arbuskulaarse mükoriisa üldiseloostus

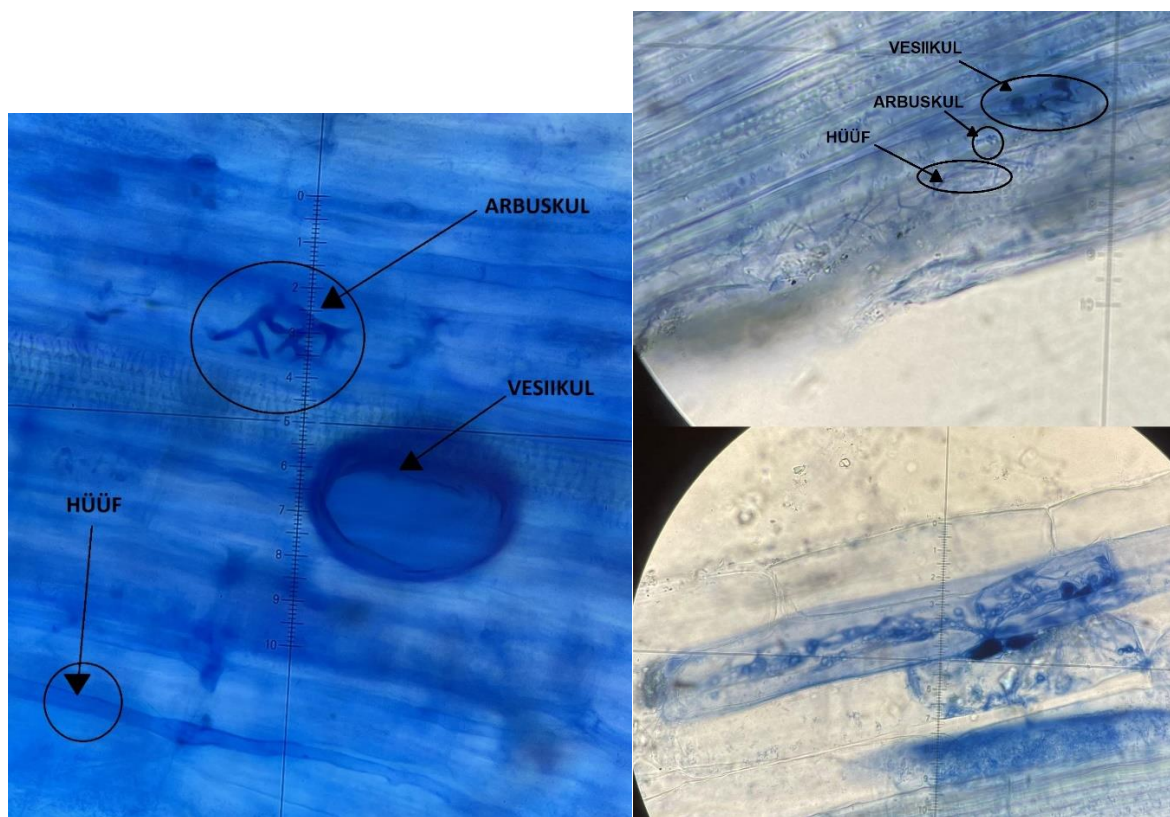
Mükoriisa ehk seenjuur on mutualistlik suhe peremeestaime ja seene vahel (Smith ja Read, 2008). Arbuskulaarne mükoriisa (AM) on kõige levinum mükoriisa tüüp, mida moodustavad hõimkonda *Glomeromycota* kuuluvad seened, eestikeelse terminiga krohmseened (Smith ja Read, 2008). Fossiilseid tõendeid arbuskulaarse mükoriisa esinemisest leidub ~450 miljoni aasta tagusest kesk-Ordoviitsiumist (Redecker jt., 2000), kuigi uuemad, molekulaarsetel analüüsidel põhinevad andmed viitavad, et hõimkonna arengu algusaeg on 200 miljonit aastat varasem (Lutzoni jt., 2018). Krohmseened moodustavad sümbiootilisi suhteid ligi 80% maismaataimeliikidega, olles levinud pea kõigis ökosüsteemides (Smith ja Read, 2008). Taim võib ligi 20% oma fotosünteesi produktidest anda partnerile (Bago jt., 2000), saades vastutasuks nii fosforit, lämmastikku kui ka muid mikrotoitaineid nagu Zn ja Cu (Smith ja Read, 2008). Lisaks on arbuskulaarsel mükoriisil ka sekundaarseid efekte taime heaolule nagu biootilise ja abiootilise stressiga toimetulek (Smith ja Read, 2008).

1.2. Krohmseente morfoloogia, taksonoomia ja liikide defineerimine

Krohmseened on obligatoorsed mutualistid, kes vajavad oma elutsükli läbimiseks peremeestaime olemasolu (Parniske, 2008). Ilma taimeta suudab seen heade tingimuste korral iseseisvalt spoorist idaneda, kuid ka see on peremeestaime hormoonide olemasolul kiirem ja efektiivsem (Akiyama jt., 2005; Besserer jt., 2006). Seen suudab mõnda aega olla ka elutsükli varases kasvufaasis ja kasvatada idutoru, kuid seda kuni programmeeritud kasvupeetuseni sümbioosiks sobiva taime puudumisel (Smith ja Read, 2008). Sobiva taime olemasolul algab aktiivne kasvufaas, peremehe juured koloniseeritakse juuresisese mütseeli poolt ning algab toitainete ja vett otsiva juurevälise hüüfivõrgustiku vohamine (Kokkoris, 2026). Juuresisese ja juurevälise mütseeli osakaal oleneb AM liigist, keskkonnatingimustest, peremeestaimest ja toitainete olemasolust (Aarle ja Olsson, 2008; Kokkoris, 2026).

Sümbioosi alguseks on olulised taime ja seene vahelised signaalmolekulid. Taim eritab strigolaktoone, mis soodustavad seenehüüfide kasvu ja hargnemist (Kobae jt., 2018). Seen vastab taimele *myc*-faktoritega, mis valmistavad taime ette kolonisatsiooniks ja arbuskulite tekkeks (Smith ja Read, 2008). Seen siseneb taime juure sisse apressooriumi abil, kust edasi kasvavad hüüfid taime juurerakkude vahele ja sisse (joonis 1). Taime rakukesta sisse tekivad AM sümbioosile iseloomulikud arbuskulid ehk põdsalaadsed seenehüüfi moodustised (joonis

1), läbi mille toimub toitainete vahetus (Smith ja Read, 2008). Vesiikulid on 80% krohmseentele iseloomulikud säilitusorganid (joonis 1), sisaldades glüko-, fosfo- ja neutraalseid lipiide (Jabaji-Hare jt., 1984).



Joonis 1. Krohmseente põhilised struktuurid trüpaansinisega värvitud talinisu juure sees. Vasakul arbuskulaarse mükoriisa põhilised struktuurid. Parem ülal ja all peenjuure endofüüdi struktuurid. 400x suurendus. Foto autor: Klaara Käämer. 08.01.2025.

Arbuskulaarset mükoriisat moodustavad seened kuuluvad hõimkonda *Glomeromycota*. Hõimkond jaotub kuueks seltsiks (*Archaeosporales*, *Diversisporales*, *Entrophosporales*, *Gigasporales*, *Glomerales*, *Paraglomerales*), mis omakorda jagunevad 17 sugukonnaks ja 52 perekonnaks (Błaszczowski jt., 2022; Wijayawardene jt., 2022). *Diversisporales*, *Gigasporales* ja *Glomerales* on kõige laiemalt levinud ja enim uuritud seltsid, sisaldades endas suuremat osa kirjeldatud liikidest (Oehl, 2026; Stürmer jt., 2018). Ülejäänud seltsid on vähem arvukad ja seetõttu ka vähem uuritud (Oehl, 2026; Wijayawardene jt., 2024).

Laiema definitsiooni kohaselt arvatakse arbuskulaarset mükoriisat moodustavate seente hulka ka hiljuti moodustatud *Mucoromycota* hõimkonna *Endogonomycetes* klassi seened (Tedersoo jt., 2024). Sinna kuuluvad lisaks saprotroofsetele ja ektomükoriissetele seentele ka endomükoriissed seeneliigid, mida nimetatakse eraldi terminiga „peenjuure endofüüdid“ (ingl *fine root endophytes*) (Rosling jt., 2024). Oma nime on nad saanud äratuntava morfoloogia

tõttu, nimelt on peenjuure endofüütide hüüfid peenemad ($<1,5\ \mu\text{m}$) kui krohmseentel ja harunevad juurtesse sisenedes lehvikulaadselt (Gianinazzi-Pearson jt., 1981). Sarnaselt krohmseentega moodustavad peenjuure endofüüdid arbuskuleid (Gianinazzi-Pearson jt., 1981) ning tunduvad täitvat sarnaseid toitainelisi ja patogeenvastaseid funktsioone nagu krohmseened (Smith ja Read, 2008). Siiski on peenjuure endofüüte veel vähe uuritud ning järeldused nende ökoloogilise nišši ja fülogeneesi kohta ebaselged (Cole jt., 2025).

Liikide defineerimine on krohmseente puhul osutunud keeruliseks mitmete aspektide tõttu: morfoloogiliselt piiratud arv tunnuseid, varieeruv eluviis olenevalt peremehest ja keskkonnast, heterokarüoossus ja kõrge liigisisene varieeruvus (Ropars jt., 2016; Rosendahl, 2008). Liigi ametlikuks nimetamiseks nõuab ICNafp (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants) molekulaarseid ja morfoloogilisi andmeid (Turland jt., 2025). See pole aga alati võimalik, kuna liigi täpseks kirjelduseks on vaja puhaskultuuri, milleks tuleb krohmseeni kasvatada *in vitro* (Cranenbrouck jt., 2005). Krohmseente laboritingimustes kasvatamine on aga keeruline ning nõuab spetsiifilisi meetodeid, kuna AM seened vajavad arenguks peremeestaimet (Cranenbrouck jt., 2005). Praeguseks on morfoloogiliselt eristatud ~250 krohmseente liiki (Schüßler ja Walker, 2010). Morfoloogia põhjal on liikide defineerimine keeruline, kuna see põhineb spooride eristamisel ja kirjeldamisel (Smith ja Read, 2008). Spooridel on aga limiteeritud morfoloogilised omadused, mis liigisiselt, aastaajaliselt ja peremeestaimest olenevalt varieeruvad (Koch jt., 2017; Walker ja Vestberg, 1998). Seega on krohmseente liigilist mitmekesisust raske objektiivselt hinnata. Lisaks ei moodusta kõik krohmseente liigid spore või teevad seda harva ning spetsiifiliste tingimuste korral (Smith ja Read, 2008). Nendel põhjustel on hakatud liikide defineerimiseks kasutama ka vaid DNA-järjestusi. Ühise süsteemi puudumise tõttu on tekkinud palju segadust, kus uurimisrühmad on võtnud kasutusele eri termineid (järjestus, liik, OTU- *operational taxonomic unit*) ja defineerinud samu fülogruppe erinevalt (Öpik jt., 2010). Probleemi lahendamiseks on kasutusele võetud virtuaalsete taksonite süsteem. Virtuaalsed taksonid on määratud SSU (ribosoomi väike subühik) rRNA geenide $\geq 97\%$ sarnasuse baasil ning pakuvad tänu andmete standardiseerimisele ja avalikule hoolikalt kureeritud andmebaasile võimaluse läbi viia metaanalüüse ja võrrelda uuringuid uurimisrühmade vaheliselt (Öpik jt., 2009). Hetkel (25.03.2026) on andmebaasis MaarjAM eristatud 387 virtuaalset taksonit (Öpik jt., 2010).

Molekulaarsetel taksonoomia ja fülogeneesi analüüsidel kasutatakse põhiliselt SSU, ITS (sisemine transkribeeritav vahejärjestus) ja LSU (ribosoomi suur subühik) rRNA geeni regioone (Kohout jt., 2014). Kasutatav SSU regioon on üsnagi konserveerunud ega võimalda kõikide liikide täpset eristamist, küll aga on see sobilik ökoloogilistes uuringutes, kus on oluline

markeri stabiilsus (Kohout jt., 2014). ITS regioonil on aga vastupidiselt SSU-le väga kõrge varieeruvus, mis teeb selle kasutamise üksikult ebasobivaks, kuid kombineerides teiste meetoditega võimaldab liike täpselt eristada (Stockinger jt., 2010). Mõlemad regioonid sobivad hästi koosluseanalüüsiks ja DNA meta-triipkoodistamiseks (ingl *DNA metabarcoding*) (Krüger jt., 2012). Vahepealsete taksonoomiliste klaadide eristamiseks sobib hästi LSU regioon, kuid seda kasutatakse palju ka SSU või ITS regiooniga kombineeritult (Raja jt., 2017). ITS regiooni on pakutud ka universaalseks arbuskulaarse mükoriisa identifitseerimise triipkoodi markeriks (ingl *DNA barcoding*), kuid tõdetakse, et ka see ei sobi kõikide liikide eristamiseks (Schoch jt., 2012).

1.3. Krohmseente ökoloogia ja levik

Arbuskulaarset mükoriisat on leitud igalt kontinendilt, kõikidest kliimavöötmest ja bioomidest (Stürmer jt., 2018). Krohmseened on generalistid ning kelle puhul esineb väga vähe endeemsust (Stürmer jt., 2018). Globaalses uuringus, mis hõlmas kuute kontinenti ja 836 juureproovi sisaldavas leiti 236 virtuaalset AM taksonit, millest 93% esines rohkem kui ühel kontinendil, 90% taksonitest leiti rohkem kui ühest kliimavöötme ja 79% nii metsa- kui rohumaadelt (Davison jt., 2015). Krohmseente mitmekesisus on suurim troopilistes vihmametsades, kus on ka taimede liigilise arvukuse tulipunkt (Smith ja Read, 2008). AM seente seltsid on küll ülemaailmselt levinud, kuid seltside ohtrus on lokaalselt erinev ja seotud nende ökoloogiliste strateegiatega. Uuringus Stürmer jt., (2018) leiti, et troopilises regioonis on ohtraimad seltsid *Diversisporales* ja *Gigasporales* ning parasvöötmes *Glomerales*.

Enamus krohmseente liike pole peremeespetsiifilised ja spetsialiseerumist esineb harva (Smith ja Read, 2008). Siiski vajavad krohmseened oma elutsükli läbimiseks peremeest, kuid taimedele sama üldistust teha ei saa. Esineb nii obligatoorselt mükoriisseid taimi, kes vajavad ellujäämiseks seene abi, kui ka fakultatiivselt mükoriisseid, kes teatud tingimustes saavad ka ilma AM sümbioosita hakkama (Smith ja Read, 2008). Mõned taimesugukonnad on hoopiski mitte-mükoriissed ja kaotanud oma võime luua sidemeid arbuskulaarse mükoriisaga ja seda arvatavasti kahel peamisel põhjusel (Lambers ja Teste, 2013). Esiteks tingimustes, kus esineb hea fosfori kättesaadavus pole taimel kasulik luua AM sümbiootilisi sidemeid, mida on täheldatud sugukondades nagu näiteks ristõielised (*Brassicaceae*), nelgilised (*Caryophyllaceae*) ja tatralised (*Polygonaceae*) (Francis ja Read, 1994; Lambers ja Teste, 2013; Olsson ja Tyler, 2004). Teiseks on mõnedel sugukondadel, näiteks lõikheinaliste (*Cyperaceae*), mardjaliste (*Haemodoraceae*) ja prootealiste (*Proteaceae*) taimedel kohastumusena

toitainevaestele pinnastele arenenud spetsiaalsed klasterjuured fosfori efektiivseks omastamiseks, mis muudab jällegi sidemed krohmseentega ebavajalikuks (Tester jt., 1987).

Taimedel on ka erinev tundlikkus ja vastuvõtlikkus mükoriisa suhtes, mis muutub olenevalt keskkonnatingimustest ning peremehe ja seene genotüübist (Berger ja Gutjahr, 2021). Mükoriissus on taimes plastiline tunnus (Zobel jt., 2024). Taimed võivad stressitingimustes või väheviljakal maal rohkem toetuda sümbiootilistele sidemetele, samas kui viljakates mullatingimustes pruugivad nad seente hulka oma juurtes hoopiski vähendada (Berger ja Gutjahr, 2021). Ka krohmseente strateegiad erinevad ning koostöö pole alati mõlemale poolele kasulik, vaid esineb teatava mutualismi-parasitismi gradiendina (Bergmann jt., 2020). Mõned krohmseeneliigid on suurepäraseid koostööpartnerid mõjudes taimele positiivselt, samas kui teised omavad neutraalset või isegi kahjulikku ja parasitismile kalduvat toimet taimele (Bergmann jt., 2020).

1.4. Krohmseente olulisus ökosüsteemis ja põllumajanduses

Euroopa Rohelepe on 2050. aastaks seadnud eesmärgi vähendada väetiste kasutust 20%, toitainete kadu 50% ja saavutada mahepõllumunduspraktikate kasutamine 25% põllumajandusmaadel. Nende eesmärkide täitmiseks nähakse suurt potentsiaali krohmseentes, just tänu nende mitmekülgsedele ja tähelepanuväärsetele positiivsetele mõjudele, mida nad nii taimedele kui ka mulla viljakusele ja tervisele pakuvad (Kumar jt., 2025).

Fosfor on taimede jaoks fundamentaalne ehituskivi nii rakumembraanides, nukleiinhapetes kui ATPs. Suur osa mullas esinevat fosforit võib olla orgaanilisel kujul (Sato jt., 2019), mis tuleb mineraliseerumise käigus muuta taimele kättesaadavateks ortofosfaadi (P_i) vormideks $H_2PO_4^-$ või HPO_4^{2-} (Vance jt., 2003). Krohmseente hüüfid on väiksema läbimõõduga (1–12 μm) kui taime juurekarvad (5–17 μm) mistõttu mahuvad need mullapooridesse, mis taimele kättesaamatuks jäävad (Lynch jt., 2005), võimaldades seega toitainete imavuspindala kuni 100 korda suurendada (Mai jt., 2019). Lisaks eritavad hüüfid aluselisi ja happelisi fosfataase, mis mineraliseerivad orgaanilise fosfori taimele kättesaadavaks P_i -ks (Shah jt., 2025). AM seened mitte ainult ei aita fosforit hankida, vaid suurendavad või käivitavad taimes olenevalt liigist teatud PHT1 perekonna fosfaadi transporterite ekspressiooni (Salvioli di Fossalunga ja Novero, 2019). On täheldatud, et AM sümbioosi soosimine krohmseenesõbralike põllupidamispraktikate või inokuleerimise kaudu aitaks vähendada fosfaatväetiste kasutamist põllumajanduses, kuid tulemused on põldkatsete puhul varieeruvad ning olenevad põllukultuurist ja keskkonnatingimustest (Qian jt., 2024; Tawaraya jt., 2012; Wu jt., 2024).

Lämmastik on sageli limiteeriv faktor taime kasvule ja arengule (Ohyama, 2010). Põldudele lämmastikväetisi lisades jääb aga kuni 50% lämmastikust kasutamata, mis liigub edasi põhjavette, avaveekogudesse või atmosfääri, põhjustades reostust (Govindasamy jt., 2023). Lisaks on see põllumajandustootjale majanduslikult ebamõistlik, kuna pool väetisele kulutatud rahast jääb tuluks pööramata. Krohmseened suudavad keskkonnast omastada valdavalt anorgaanilisi lämmastikühendeid $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, kuid ka orgaanilisi ühendeid (Cruz jt., 2007; Hodge ja Fitter, 2010; Hodge ja Storer, 2015). Seene poolt omastatud lämmastik transporditakse osaliselt peremeestaimele või kasutatakse enda tarbeks, mistõttu kasutatakse rohkem lämmastikku ära ja väheneb leostumine (Asghari ja Cavagnaro, 2011; van der Heijden, 2010). Mulyadi ja Jiang (2023) leidsid, et AM seente inokulaatide lisamine koos lämmastikväetistega suurendab riisi saagikust kuni 32% ja lämmastiku omastamist kuni 108% võrreldes kontrollkatsega. Samas on täheldatud, et kõrge väetustase võib hoopis AM sümbioosi inhibeerida ning selgusetu on ka, kui palju lämmastikku tegelikult taimele transporditakse (Blanke jt., 2005).

Krohmseened aitavad kultuurtaimedel tulla toime mikrotoitainete puudusest tuleneva stressiga (Moreno Jiménez jt., 2024). AM seened suurendavad juurte imavuspindala hüüfivõrgustikuga ja eritavad mulda metalle (Zn, Fe) mobiliseerivaid aineid, aidates taimel omastada mikrotoitaineid nagu tsinki, rauda, vaske, mangaani jt., mis on olulised ensüümide, fotosünteesi ja taime kasvu tarbeks. (Ahmed ja Holmström, 2014).

Sümbioos AM seentega aitab taimel stressiga toime tulla, leevendades keskkonnamõjusid nagu liigne soolsus, põud ja mürgised raskemetallid (Wahab jt., 2023). AM seened suurendavad juurte imavuspindala, võimaldades ligipääsu muidu taimele kättesaamatuks jäävale veele (Augé, 2001). Liigse soolsuse korral mõjutavad AM seened erinevate geenide ekspressiooni, mis aitavad taimel säilitada K^+ ja Na^+ ionide homöostaasi, akumulierida abstsissiinapet ja stimuleerida antioksüdantide tootmist taimes (Evelin jt., 2009). Ka metallide (Cd, Pb, As) mürgist mõju aitavad AM seened leevendada, vähendades nende kättesaadavust mullas. Esiteks eritades glomaliini, mistõttu raskemetallid kelaatuvad (González-Chávez jt., 2004) ning teiseks põhjustades metalliioonide adsorptsiooni hüüfiraku pinnale (Joutey jt., 2015).

AM seente kohalolu juurtes aitab suurendada resistentsust erinevate mullapatogeenide vastu nagu närbumist ja juuremädanikku põhjustavad seened, munasseened, nematoodid ja bakterid (Whipps, 2004). Krohmseente sisenemine juurtesse põhjustab taimes patogeenvastaste ainete nagu fütoaleksiinide ja kitinaaside tootmist, mistõttu on taim paremini valmis patogeenide rünnakuks (Gianinazzi-Pearson jt., 1994). Sama toimub ka taimehormoonidega, eriti suurt korrelatsiooni patogeeniresistentsuse ja hormooni taseme tõusu vahel AM infektsiooniga

taimedel on nähtud jasmoonhappe puhul (Cordier jt., 1998; Hause jt., 2007). AM seened vähendavad juuresiseste patogeenide edukust konkureerides ruumi, infektsioonikohtade ja süsiniku eest (Wehner jt., 2010). Kontrolltingimustes on nähtud ka tõendeid, et mükoriisavõrgustik on võimeline patogeenvastaseid kaitsesignaale ühelt taimelt teisele edastama, tõstes veel nakatumata taimes kaitseensüümide taset (Song jt., 2010).

Krohmseentel on oluline roll mulla füüsikaliste omaduste parandamisel ja säilitamisel. Täpsemalt toodavad krohmseened hüdrofoobset glükoproteiini glomaliin, mis on struktuurvalk hüüfides ja spoorides, mille püsivus mullas on kuni 42 aastat (Rillig jt., 2001). Seenestruktuuride lagunedes koguneb glomaliin mulda toimides kleepuva agendina mullaosakeste vahel (Driver jt., 2005). Tekkivad makroagregaadid ($>250\ \mu\text{m}$) suurendavad mulla poorsust, imbuvus, mulla veepotentsiaali, paraneb mulla veehoidmise võime ning üleüldiselt väheneb toitainete leostumine ja mulla erosioon (Burri jt., 2013; Wright ja Upadhyaya, 1998). Arbuskulaarne mükoriisa panustab ka märkimisväärselt mullasisese orgaanilise süsiniku varudesse nii juurevälise mütseeli kui glomaliini kaudu (Miller jt., 1995; Zhou jt., 2024).

Põllumuldade majandamisel on suur mõju krohmseente biomassile ja mitmekesisusele. Kuna arbuskulaarne mükoriisa on eriti levinud pealmises mullakihis, põhjustab kündmine spooride ja hüüfitükkide sattumist sügavamatesse mullakihtidesse, vähendades võimalust peremeestaimega kokku sattuda (Kabir, 2005). Seetõttu tuleks eelistada vähest või pindmist kündmist (Kabir, 2005). Suurtes kogustes mineraalväetiste kasutamine vähendab AM-seente biomassi ja liigilist mitmekesisust, mille asemel soovitatakse hoopis kasutada orgaanilisi ning krohmseente populatsiooni toetavaid alternatiive (Jiang jt., 2021). Eriti laastav toime krohmseente mitmekesisusele on pestitsiidide, eriti fungitsiidide, kasutamine kombineeritult mineraalväetistega (Vahter jt., 2022). Siiski on keemiliste taimekaitsevahendite mõju krohmseentele veel vähe uuritud ning teema vajab rohkem avamist enne regulatsioonide ja soovitude tegemist (Pagano jt., 2023). Selleks, et parandada krohmseente rohkest ja mitmekesisust põllumuldades tuleb nende koosluste struktuuri ja biomassi regulaarselt hinnata ning saadud andmete baasil teha vastavaid soovitusi ja muudatusi põllumajanduspraktikates.

1.5. Arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimine

Kui kvalitatiivsed analüüsid annavad informatsiooni proovis esinevatest liikidest, siis kvantitatiivsed võimaldavad hinnata AM seente biomassi ja ohtrust. Kvantitatiivsed AM seente kolonisatsiooni andmeid kogutakse, et uurida taimede toitumist ja sümbiootiliste sidemete

olemust krohmseentega (Smith ja Read, 2008), mõõta AM inokulantide efektiivsust (Köhl jt., 2016), võrrelda harimispraktikate mõju mullale ning analüüsida üldist mulla tervist (Abbott ja Lumley, 2014).

1.5.1. Mikroskopeerimisel põhinevad meetodid

Üks viis krohmseente kvantifitseerimiseks on nende visualiseerimine, tuvastamine ja rohkuse hindamine taimejuurtes. Seega on juurte mikroskopeerimine kõige otsesem reaalselt funktsioneeriva AM seente kvantifitseerimise meetod. Seenestruktuuride visualiseerimiseks eemaldatakse peremehe juure seest tsütoplasma, kuumutades neid KOH lahuses (Phillips ja Hayman, 1970). Seejärel värvitakse juured värviga, näiteks tindi või trüpaansinisega (Phillips ja Hayman, 1970; Wilkes, 2023). Põhiliselt on kvantifitseerimisel kasutusel neli juurte ning üks spooride mikroskopeerimise meetodika (tabel 1).

Krohmseente kvantifitseerimist kasutati teadaolevalt esimest korda 1975. aastal, kus rakendati praeguseks levinuimat AM seente mikroskopeerimisel kasutatavat ruudustiku ristumismeetodit (ingl *grid-line intersect method*), mis algselt loodi juurepikkuse määramiseks (Koide ja Mosse, 2004; Newman, 1966; Sparling ja Tinker, 1975). Ristumismeetodil asetatakse värvitud juured ruudustikuga Petri tassile ning vaadatakse mikroskoobiga igat juure ja ruudustiku joone ristumiskohta ja märgitakse, kas AM struktuurid on olemas või puuduvad (Sparling ja Tinker, 1975). Meetod on kiire ja lihtne ning selle abil saab efektiivselt hinnata nii nakatunud juurte osakaalu kui nende kogupikkust (Sun ja Tang, 2012), kuid kuna kasutatavad suurendused on kuni 100x on õige tulemuse saamiseks vaja äärmiselt kvaliteetset värvimistulemust (Kokkoris jt., 2019).

Üle 200x suurendusega ristumismeetodi (ingl *magnified intersections method*) töötasid välja McGonigle jt. (1990), et määrata konkreetsete AM struktuuride – hüüfide, arbuskulite ja vesiikulite – esinemise sagedust. Värvitud juured prepareeritakse mikroskoobislaidile ning igast slaidist tehakse 100-150 vaadet, kus iga vaate puhul märgitakse niitristi läbivad seenestruktuurid (McGonigle jt., 1990). 200x suurenduse puhul on võimalik määrata hüüfe ja vesiikuleid, kuid täpsemateks määranguteks ja arbuskulite nägemiseks tuleb kasutada 400x suurendust. Meetod vajab võrreldes teistega põhjalikumalt väljaõpet ning on aeganõudvam (Kokkoris jt., 2019).

Kasutusel on ka juuresegmendi pluss-miinus meetod, kus 1 cm pikkused juuresegmendid paigutatakse mikroskoobi slaidile. Seejärel loetakse kokku mitmel segmendil esineb mistahes seenestruktuure ning tulemus jagatakse kolonisatsiooni protsendi leidmiseks kogu

juuresegmentide arvuga (Nicolson, 1955). Samas kipub see kolonisatsiooni võrreldes teiste meetoditega üle hindama ega anna detailset informatsiooni seenestruktuuride kohta (Sun ja Tang, 2012).

Selle edasiarendus, kolonisatsiooni ohtruse meetod (Trouvelot, 1986), võtab arvesse ka infektsiooni tugevust ehk kui suur osa igast juuretükist on koloniseeritud seene poolt, andes rohkem teavet sümbioosi olemuse ja tugevuse kohta. Siiski ei anna see andmeid vesiikulite kohta ning kolonisatsiooni rohkuse hindamine on subjektiivne ega võimalda uurimusi omavahel võrrelda (Kokkoris jt., 2019). Kõikide meetodite probleemiks on ka mikroskopeeritavate juurte valik, mis võib uurimistulemusi kallutada, kuna AM pole juurestikus ühtlaselt levinud (Kokkoris jt., 2019).

Veel üks võimalus hinnata AM ohtrust on spooritiheduse arvutamine. Selleks lahustatakse 30-100g mulda vees ning sõelutakse läbi eri tihedusega sõelte vahemikus 1mm-40 μ m, nendele jäänud sisu pannakse Petri tassile ning loetakse (Gerdemann ja Nicolson, 1963). Enne loendamist saab täiendavaks puhastamiseks sõelutud materjali lahustada 2M sahharoosi-NaCl lahuses ning tsentrifuugida, spoorid kogunevad supernatanti ning raskemad mullaosakesed sademesse (B. A. Daniels ja Skipper, 1982). Kuna spooride arv on mõjutatud temperatuurist, mulla keemilisest koostisest, taimeliikidest ja krohmseene liigist, pole meetod sobilik metaanalüüsideks (Zhang jt., 2016; Verzeaux jt., 2017).

Tabel 1. Kokkuvõttev tabel arbuskulaarse mükoriisa (AM) mikroskopeerimisel kasutatavatest meetoditest (Kokkoris jt., 2019; Sun ja Tang, 2012).

Meetod ja autor	+	-	Mida näitab?	Mida tehakse?
<i>Root segment estimation method</i> ehk kolonisatsiooni ohtruse meetod Trouvelot et al (1986)	Võimaldab hinnata kolonisatsiooni intensiivsust	Rohkuse hindamine 5-palli skaalal on subjektiivne	Kolonisatsiooni sagedus % Arbuskulite rohkus % Kolonisatsiooni intensiivsus juuresüsteemis % Kolonisatsiooni intensiivsus juurefragmendis %	1cm pikkused juured mikroskoobislaidil Iga segmendi puhul hinnatakse kui tugev on kolonisatsioon 5-palli skaalal Märgitakse ka arbuskulite esinemist
<i>Root segment ± method</i> ehk juuresegmendi pluss-miinus meetod Nicolson, T. H. (1955)	Lihtne ja kiire Kergesti korratav Üsna objektiivne	Hindab kolonisatsiooni üle Täpsus oleneb suuresti valitud juurtest	Kolonisatsiooni %	1cm pikkused juured mikroskoobislaidil Kas segmendis on AM või mitte
<i>Grid-line intersect method</i> ehk ruudustiku ristumismeetod Sparling and Tinker (1975)	Kiireim meetod Korreleerub teiste meetoditega samade taimeliikide puhul	Vajab head värvimise kvaliteeti Madal suurendus Ei võimalda eristada erinevaid AM struktuure	Kolonisatsiooni %	Juured on ruudustikuga Petri tassil, vaadatakse igat ruudustiku joone ja juure ristumiskohta
<i>Magnified intersections method</i> ehk suurendusega ristumismeetod McGonigle et al (1990)	Detailne info AM struktuuride kohta	Aeglane Nõuab põhjalikku väljaõpet Subjektiivne	Kolonisatsiooni % Arbuskulite % Vesiikulite % Hüüfide %	Juured on mikroskoobislaidil, igast slaidist tehakse 100-150 vaadet, märgitakse struktuure
Spooritiheduse arvutamine Gerdemann and Nicholson, (1963)	Lihtne Võimaldab mingil määral liike eristada	Tulemus on suuresti mõjutatud keskkonnatingimustest Ei ole võrreldav teiste uurimustega	Spooride arv grammi mulla kohta	Spoorid pestakse mullast välja, asetatakse Petri tassile ja loetakse

1.5.2. Rasvhapete analüüs

Rasvhapped on peamised rakumembraanide ehituskivid ning olulised varuainete säilitajad (de Carvalho ja Caramujo, 2018). Erinevatel organismirühmadel on spetsiifilised rasvhappestruktuurid, mistõttu sobivad need hästi mikroorganismide tuvastamiseks ja mikroobikoosluste iseloomustamiseks (Schutter ja Dick, 2000). Krohmseente puhul määratakse 16:1ω5 fosfolipiidseid ja rasvhappeid (PLFA) neutraalseid rasvhappeid (NLFA) (Johansen jt., 1996). Kasutusel on ka estriga seotud rasvhapete (ELFA) määramine, mis sisaldab endas neutraalseid, fosfolipiidseid ja glükolipiidseid rasvhappeid (Schutter ja Dick, 2000).

Rasvhapete analüüsil eraldatakse kõigepealt proovist lipiidid, kasutades kloroformi ja metanooli. Järgmiseks fraktsioneeritakse lipiidid neutraalseteks lipiidideks, glükolipiidideks ja fosfolipiidideks. Ümberesterdamise käigus muudetakse lipiidid lenduvamaks, et neid oleks võimalik identifitseerida ja kvantifitseerida gaasikromatograafia ja leekionisatsiooni-detektori abil. Krohmseente indikaatoriks kasutatakse nii PLFA 16:1ω5 kui ka NLFA 16:1ω5 (Frostegård jt., 1993; Van Aarle ja Olsson, 2003).

PLFA 16:1ω5 on krohmseente rakumembraanide koostisosa (Beilby, 1980). Kuna PLFA laguneb mullas kiiresti arvatakse, et see peegeldab just elus või hiljuti surnud organismide esinemist (Olsson, 1999; White jt., 1979). PLFA-d kasutatakse peamiselt biomassi ja mikroobikoosluste koosseisu hindamiseks (Frostegård jt., 1991). Biomassi arvutamisel tuleb aga arvestada, et fosfolipiidsed rasvhapped on otseselt seotud rakumembraani pindalaga, mistõttu ei pruugi olla nende hulk biomassiühiku kohta kõigis hüüfistruktuurides ega organismides sama (Schnürer jt., 1985). PLFA 16:1ω5 pole iseloomulik ainult krohmseentele, vaid seda toodavad ka Gram-negatiivsed bakterid (Zelles, 1997). Kuni 70% mullaproovides tuvastatud PLFA 16:1ω5-st võib pärineda bakteritest või muudest organismidest, mistõttu on tegeliku arbuskulaarse mükoriisa biomassi täpne hindamine keeruline (Lekberg jt., 2022). Seetõttu soovitatakse mullaproovide puhul biomassi adekvaatseks hindamiseks mõõta ka NLFA 16:1ω5, hinnata bakteriaalset biomassi ja taustal esinevat PLFAd ning kasutada mittemükorisseid kontrolle (Olsson, 1999). Juurtes esineb baktereid oluliselt vähem ning on leitud, et 94% PLFA 16:1ω5 on AM päritolu (Lekberg jt., 2022). Seega on PLFA analüüsid juureproovide korral sobilikud krohmseente biomassi hindamiseks.

Krohmseened talletavad energiavarusid triglütseriididena, mis tavaliselt teistele mullas esinevatele mikroorganismidele iseloomulik pole, mis teeb NLFA 16:1ω5-st spetsiifilise markeri AM seente olemasolust (Wältermann ja Steinbüchel, 2005). Krohmseened kasutavad NLFA 16:1ω5-d energiavarude hoiustamiseks, seega peegeldab see peamiselt spooride ja

vesiikulite biomassi, kuid seda leidub vähesel määral ka hüüfides (Müller jt., 1994). Mullaproovide puhul sobib NLFA 16:1ω5 krohmseente biomassi hindamiseks, kuid juureproovides võib see meetod AM biomassi alahinnata (Ngosong jt., 2012). Lisaks ei ole NLFA 16:1ω5 spetsiifiline kõigile AM kladidele ning esindab peamiselt seltse *Diversisporales* ja *Glomerales* (Graham jt., 1995; Olsson ja Lekberg, 2022). Piirkondades, kus domineerivad seltsi *Gigasporales* esindajad, soovitatakse lisaks analüüsida ka NLFA 20:1ω9 (Graham jt., 1995; Olsson ja Lekberg, 2022). Kuna NLFA on seotud energiatalletusega, peegeldab see spooride ja vesiikulite biomassi näol ka krohmseente energiaseisundit ja metaboolset aktiivust (Lekberg jt., 2022; Olsson ja Lekberg, 2022).

ELFA mõõtmine on oma laia haarde, kiiruse ja lihtsuse tõttu sobilik proovide esmasteks analüüsideks või rutiinseks mullaseireks, kuid see pole vähese spetsiifilisuse tõttu eriti kasutatud meetod (Sharma ja Buyer, 2015; Yu jt., 2021).

1.5.3. Molekulaarsed meetodid (qPCR, meta-triipkoodistamine)

Krohmseente kvantifitseerimisel kasutatakse aina enam ka reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR). Meetod on kiire, objektiivne, efektiivne suure proovide arvu korral ja võimaldab AM detekteerida isegi väikestes kogustes (Corona Ramírez jt., 2023). Vastavalt valitud praimeritele on võimalik uurida kindlaid liike või tervet hõimkonda, sihtida markergeene tuumas või mitokondris (Voříšková jt., 2017). Andmete normaliseerimise põhiselt jagunevad qPCR meetodid kaheks: relatiivne ja absoluutne. Relatiivse qPCR-i puhul normaliseeritakse sihtgeeni koopiaarvu tulemused võrdlusgeeni suhtes ja tulemus väljendatakse suhtena (Schmittgen ja Livak, 2008). Absoluutse qPCR-i puhul arvutatakse sihtgeeni koopiaarv võrreldes standardkõveraga (Gamper jt., 2008). Relatiivse qPCR-i tehes on proovide ettevalmistusaeg väiksem, kuid absoluutse qPCR puhul on väga oluline täpsus ja proovidevaheliselt normaliseerida juurte kaal (Bodenhausen jt., 2021). Samas on relatiivse qPCR proovide arv poole suurem ning tähtis valida õige võrdlusgeen ja sobivad praimerid (Bodenhausen jt., 2021). Siiski on reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni krohmseente kvantifitseerimisel veel vähe kasutatud, kuna qPCR annab andmeid geenikoopiate, mitte tegeliku kolonisatsiooni või biomassi kohta ehk meetod sobib krohmseente koosseisu ja geneetilise mitmekesisuse uurimiseks (Arruda jt., 2022). Olenevalt krohmseente liigist, aastaajast ja keskkonnast on nendes ka erinev tuumade arv, seega ka amplifitseeritava DNA hulk, mistõttu ei ole tulemused omavahel ega teiste kvantifitseerimise meetoditega võrreldavad (Gamper jt., 2008). Paljulubavaid tulemusi qPCR-ga kvantifitseerimisel on nähtud küll kontrolltingimustes

üksikute liikidega, kuid looduslikes või põllumajanduslikes tingimustes korrelatsioonid enam nii selged pole (Arruda jt., 2022; Corona Ramírez jt., 2023). Lisaks on katsete läbiviimiseks vaja mõningase vilumuse ja täpse käega inimest hästi varustatud laboris. Meetodi laiemaks kasutuselevõtmiseks on vaja teha veel katseid eri liikidega ja eri tingimustes ning proovida leida paremaid sihtmärkgeene ja praimereid.

Meta-triipkoodistamise käigus paljundatakse kindlat lühikest DNA regiooni, mis on iga liigi puhul unikaalne ning hiljem amplikone referentsandmebaasi vastu võrreldes on võimalik liike eristada (Hebert jt., 2003). Krohmseente puhul on kasutusel SSU ja ITS rRNA regioonid (Krüger jt., 2012). Meta-triipkoodistamine annab informatsiooni mullas olevate liikide kohta ning on ka semi-kvantitatiivne, kuna sekveneerimisel saadud lugemite arv peegeldab umbkaudselt liigilist ohtrust mullas (Lamb jt., 2019). Siiski ei ole see ideaalne meetod ohtruse ja biomassi väljendamiseks ning kipub neid alahindama mitmel põhjusel: liikidel on varieeruv DNA koopiaarv, samad PCR praimerid töötavad liikidevaheliselt erinevalt ning DNA eraldamise ja amplifitseerimise efektiivsus võib proovide ja taksonite vahel varieeruda (Alteio jt., 2021). Lisaks tugineb meta-triipkoodistamine tõenduspõhiste ja põhjalikele referentsandmebaasidele, mis on küll krohmseente puhul olemas, kuid teatud vähemlevinud taksonite puhul veel täienemas (Nilsson jt., 2019; Öpik jt., 2010). Samas võimaldab meta-triipkoodistamine tuvastada ka väikeste DNA koguste korral rohkem liike kui ükski teine varem mainitud meetod, aidates neid seostada reaalsete ökoloogiliste protsessidega (Alteio jt., 2021).

2. UURIMUS

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida ja võrrelda kahte arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimise viisi: juurte mikroskopeerimist ja fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi. Töö raames otsiti vastuseid järgmistele uurimisküsimustele:

1. Kas juurte mikroskopeerimise ja fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi tulemused on omavahel statistiliselt oluliselt positiivselt seotud?
2. Millised on mõlema meetodi eelised ja puudused eri kontekstides?

Autor püstitas hüpoteesi, et juurte mikroskopeerimise ja rasvhapete analüüsid on positiivselt seotud. Seose tugevus varieerub arbuskulite, vesiikulite ja kogu kolonisatsiooni puhul, olles arbuskulite puhul vähem seotud kui vesiikulite ja kogu kolonisatsiooni korral.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Andmed

Andmed pärinevad 2024. aasta Maaelu Teadmuskeskuse projektist „Väetamise ABC“ (<https://metk.agri.ee/vaetamise-abc>). Põldkatsed viidi läbi neljas katsekeskuses: Võrus, Jõgeval, Kuusikul ja Viljandis. Andmestikku valiti 2024. aastal kasvatatud kultuuridest kuus enam levinud liiki: uba (*Vicia faba*), hernes (*Pisum sativum*), kaer (*Avena sativa*), suvioder (*Hordeum vulgare*), talinisu ja suvinisu (*Triticum aestivum*). Neist kõiki liike kasvatati Jõgeval ja Kuusikul, Viljandis vaid uba, hernel, talinisu ning Võrus kaera, suviotra ja suvinisu. Uuringus rakendati põllukultuuridele olenevalt liigist ja mullaviljakusest kolme lämmastikväetise taset vahemikus 60-100 kg/ha. Muid vajalikke mikrotoitaineid ning pestitsiide lisati vastavalt riiklikele soovitudele ning regionaalsetele eripäradele. Juureproovid koguti viljapea loomise lõpus. Igalt 5 m² proovilapilt võeti juhuslikult kolm taime ja liideti üheks prooviks. Samal päeval eemaldati, puhastati juured ning kuivatati need ränigeeli abil edasisteks analüüsideks. Andmestikku tuli seega 3 asukohta x 6 põllukultuuri x 3 lämmastikväetise astet x 3 kordust = 162 andmepunkti (Torppa jt., submiteeritud käsikiri).

2.2.2. Analüüsimeetodid

2.2.2.1. Mikroskopeerimine

Mikroskopeerimise ja juurte värvimise viis läbi autor 2025. a. Kuivatatud juurefragmendid värviti, kasutades trüpaansinise metoodikat (Koske ja Gemma, 1989), kuna see on varasemalt

andnud stabiilsemaid tulemusi kui tindiga värvimise meetodikad. Juhuslikud juureosad asetati värvimiseks proovi kaupa märgistatud kassetidesse ning vähemalt 12 tunniks vette. Kassetid asetati siis 2,5% KOHga peekritesse ning kuumutati >85°C vesivannis 11 minutit, et eraldada juure rakkudest tsütoplasma. Seejärel loputati kassetid vees ning jäeti tunniks 4% HCl lahusesse hapestuma, et värv paremini kinnituks. Viimaseks täideti peekrid 0,05% trüpaansinise lahusega ning peekreid kuumutati vesivannis >85°C 13 minutit. Kassetid loputati ning hoiustati enne mikroskopeerimist vähemalt üleöö happelises glütseroolis.

Mikroskopeerimisel kasutati McGonigle jt. (1990) meetodit, kus mikroskoobi alusklaasile prepareeriti happelise glütserooliga 16 umbkaudu 1 cm juure lõiku. Ühest proovist tehti mikroskoobil (Zeiss Axioscope 5) 400x suurendusega 100 vaadet ning iga vaate puhul märgiti niitristi läbivate hüüfide, arbuskulite ja vesiikulite olemasolu, et määrata iga struktuuri protsentuaalne esinemine. Kokku on töös kolm kolonisatsiooni mõõtu: kogu kolonisatsioon (hüüfid+arbuskulid+vesiikulid), arbuskulite kolonisatsioon ja vesiikulite kolonisatsioon. Eraldi hüüfide kolonisatsioon puudub, kuna iga kord kui esines mõni AM struktuur märgiti ka hüüf, kuna arbuskulid ja vesiikulid ei saa esineda ilma hüüfita.

2.2.2.2. Fosfolipiidsete rasvhapete analüüs

Rasvhapete analüüs viidi läbi Tartu Ülikooli mullaökoloogia töörühmas 2025. a. Juureproovide rasvhapete analüüs viidi läbi Van Aarle ja Olssoni meetodikat 96-augulisele plaadile kohandades (Van Aarle ja Olsson, 2003). Lipiidid eraldati tsentrifuugimise käigus ~150mg kürogeenselt purustatud juurtest (kasutades vedelat lämmastikku) ühefaasilises kloroformi, metanooli ja tsitraadipuhvri segus. Supernatandile lisati veel kloroformi ja tsitraadipuhvrit ning see läks edasi faasieraldusse. Lipiide sisaldav alumine faas koguti ja kuivatati 40°C juures, kasutades lämmastikgaasi. Lipiidid fraktsioneeriti silikageelil põhineval 96-kaevulisel tahkefaasilise ekstraheerimise plaadil neutraalseteks lipiidideks, glükolipiidideks ja fosfolipiidseteks, kasutades eluentidena vastavalt kloroformi, atsetooni ja metanooli. Fosfolipiidid kuivatati ning sisemise standardina lisati nonadekaanhappe metüülester (Me19:0). Lipiidid ümberesterdati kerge aluselise metüülimise teel, kasutades kaaliumhüdrosiidi, metanooli ja tolueeni segu temperatuuril 37 °C. Seejärel reaktsioon peatati etaanhappe lisamisega. Pärast faasieraldamist kloroformiga koguti lipiide sisaldav alumine faas ning kuivatati taas lämmastiku all. Saadud rasvhapete metüülestrid lahustati tolueenis ja analüüsiti gaasikromatograafia abil leekionisatsiooni-detektoriga (GC-FID), järgides (Frostegård jt.,

1993) meetodikat. Rasvhapete kontsentratsioonid arvutati võrreldes sisestandardühendiga. AM seente biomassi biomarkerina kasutati PLFA 16:1 ω 5 (Olsson ja Johansen, 2000).

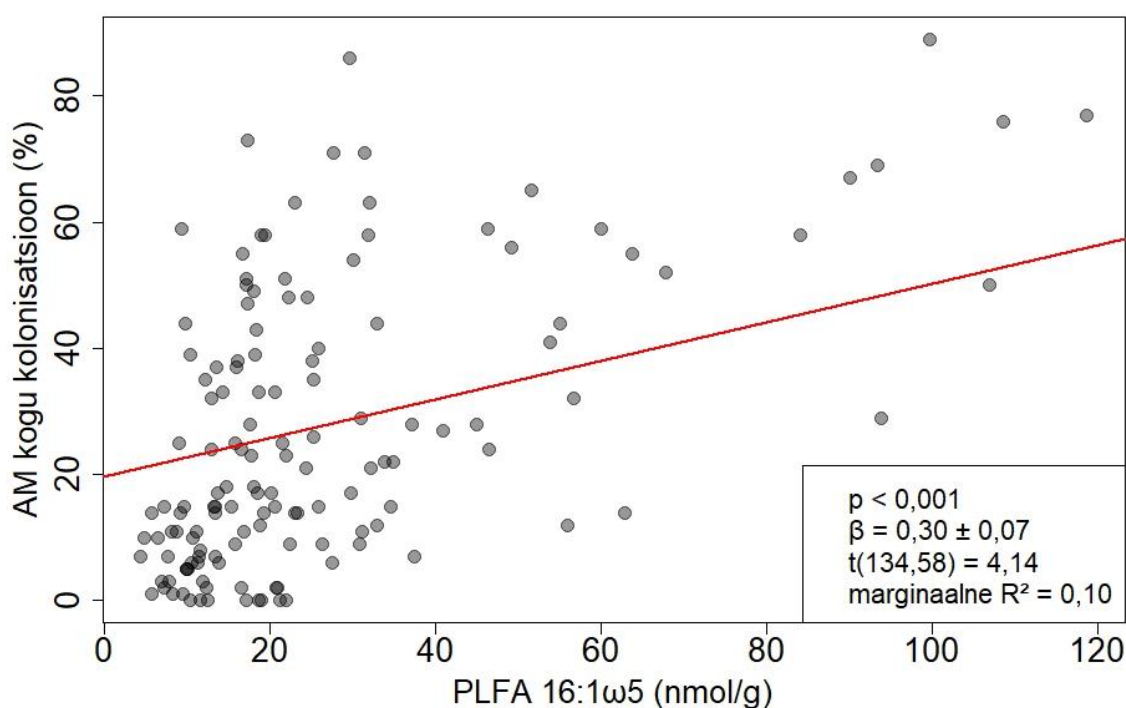
2.2.2.3. Andmete analüüs

Andmete analüüsi viis läbi käesoleva töö autor. Analüüsides kasutati vabavara R versiooni 4.5.2 (R Core Team, 2025) ja RStudio versiooni 2026.01.0.392 (Posit team, 2026). Uuringu ülesehitusest tulenevalt olid sama katseala piires proovid üksteisest sõltuvad ning korrelatsioonitestide asemel kasutati lineaarset segaefektide mudelit (ingl *linear mixed-effects model*) ja kasutati funktsiooni *lmer* paketist „lme4“ (Bates jt., 2015). Mudeli eeldusteks olid lineaarne seos PLFA ja AM kolonisatsiooni vahel, mudeli jääkide normaaljaotus (ingl *normality of residuals*) ja homoskedastilisus (ingl *homoscedasticity of residuals*), mida kontrolliti diagnostiliste diagrammidega. Kokku viidi läbi kolm analüüsi, kus sõltumatuks muutujaks (ingl *fixed explanatory variable*) võeti PLFA (nmol/g) ja sõltuvaks muutujaks (ingl *response variable*) vastavalt katsele AM kogu kolonisatsioon (%), vesiikulite kolonisatsioon (%) või arbuskulite kolonisatsioon (%). Mudeli struktuur oli järgmine: AM kolonisatsioon ~ PLFA + (1|katseala asukoht) + (1|katseala asukoht:põllukultuur). Vaatamata muutujate korrelatiivsele seosele, nõuab lineaarne mudel ühe määramist sõltumatuks ja teise määramist sõltuvaks muutujaks. Valiku tegemiseks sobitati mudelid mõlemas suunas ning hinnati jääkide normaaljaotust ning homoskedastilisust. Juhuslikeks faktoriteks (ingl *random effects*) olid katseala asukoht ja põllukultuur. Andmete normaaljaotuse parandamiseks transformeeriti arbuskulite ja vesiikulite kolonisatsiooni andmed kasutades funktsiooni *logit* paketist „car“ (Fox jt., 2001). AM kogu kolonisatsiooni andmed jäeti transformeerimata, kuna mudeli eeldused olid täidetud.

Funktsiooniga *Anova* paketist „car“ testiti PLFA ja AM vahelise seose sõltuvust katseala asukohast ja põllukultuuri liigist (Fox jt., 2001). Selleks kasutatud mudel katseala asukoha puhul: AM kolonisatsioon ~ PLFA*katseala asukoht + (1|katseala asukoht:põllukultuur). Põllukultuuri puhul: AM kolonisatsioon ~ PLFA*põllukultuur + (1|katseala asukoht) + (1|katseala asukoht:põllukultuur). Kõikide analüüsides puhul hinnati tulemus statistiliselt oluliseks, kui *p*-väärtus oli < 0,05. Andmepunkte on AM kolonisatsiooni kohta 162 ning PLFA puhul 138, 24 langes vähese juurematerjali tõttu välja. Programmeerimisprobleemide tuvastamiseks kasutati tehisaru ChatGPT (OpenAI, 2026).

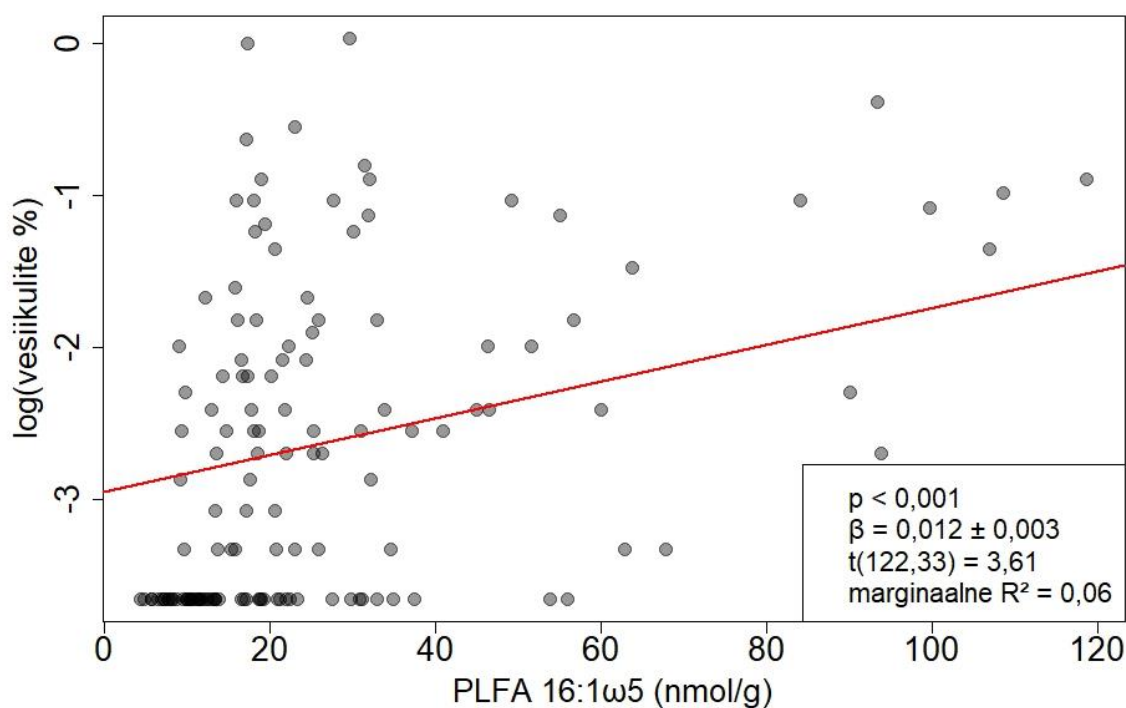
2.3. Tulemused

PLFA 16:1 ω 5 ja AM kogu kolonisatsioonil oli statistiliselt oluline positiivne seos (joonis 2). β ehk beetakordaja hinnang näitas, et kui PLFA 16:1 ω 5 suurenes ühe ühiku võrra, suurenes AM kogu kolonisatsioon 0,30 ühiku võrra. Standardviga (SE) näitas, kui palju β võib kõrvale kalduda ehk $\beta = 0,30 \pm 0,07$. PLFA üksi seletas 10,4% varieeruvusest AM kogu kolonisatsioonist (marginaalne $R^2 = 0,10$). Terve mudel koos fikseeritud ja juhuslike muutujatega seletas 62,4% tervest varieeruvusest AM kogu kolonisatsioonist (konditsionaalne $R^2 = 0,624$). PLFA 16:1 ω 5 ja AM kogu kolonisatsiooni vaheline seos ei sõltunud katseala asukohast ($F_{(3, 129)} = 1,25$; $p = 0,30$) ega põllukultuuri liigist ($F_{(5, 40)} = 1,61$; $p = 0,19$).



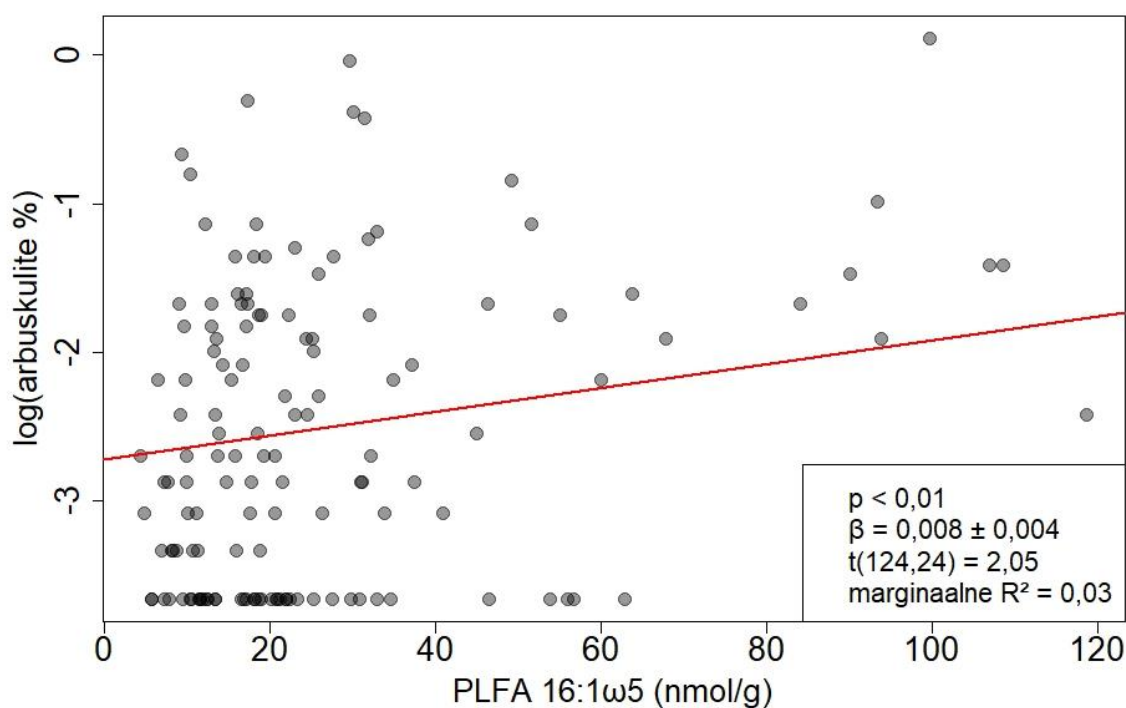
Joonis 2. Seos fosfolipiidse rasvhappe (PLFA) 16:1 ω 5 kontsentratsiooni ja arbuskulaarse mükoriisa (AM) kogu kolonisatsiooni vahel. Joonisel on punaselt tähistatud regressioonijoon ja punktid tähistavad üksikuid proove. Paremal allnurgas on näidatud lineaarsete segaefektide mudeli tulemused.

PLFA 16:1 ω 5 ja vesiikulite kolonisatsiooni vahel oli statistiliselt oluline positiivne seos (joonis 3). PLFA 16:1 ω 5 seletas 6% varieeruvusest ning terve mudel 68% varieeruvusest (marginaalne $R^2 = 0,06$; konditsionaalne $R^2 = 0,68$). PLFA 16:1 ω 5 ja AM vesiikulite kolonisatsiooni vaheline seos ei sõltunud katseala asukohast ($F_{(3, 109)} = 2,47$; $p = 0,066$) ega liigist ($F_{(5, 34)} = 2,19$; $p = 0,078$).



Joonis 3. Seos fosfolipiidse rasvhappe (PLFA) 16:1 ω 5 kontsentratsiooni ja log-transformeeritud vesiikulite kolonisatsiooni vahel. Joonisel on punaselt tähistatud regressioonijoon ja punktid tähistavad üksikuid proove. Paremal allnurgas on näidatud lineaarsete segaefektide mudeli tulemused.

PLFA 16:1 ω 5 ja arbuskulite kolonisatsiooni vahel oli statistiliselt oluline positiivne seos (joonis 4). PLFA 16:1 ω 5 seletas 3% varieeruvusest ning terve mudel 51% varieeruvusest (marginaalne $R^2 = 0,03$; konditsionaalne $R^2 = 0,51$). PLFA 16:1 ω 5 ja AM arbuskulite kolonisatsiooni vaheline seos ei sõltunud katseala asukohast ($F_{(3, 121)} = 0,13$; $p = 0,944$) ega liigist ($F_{(5, 73)} = 0,24$; $p = 0,9453$).



Joonis 4. Seos fosfolipiidse rasvhappe (PLFA) 16:1 ω 5 kontsentratsiooni ja transformeeritud arbuskulite kolonisatsiooni vahel. Joonisel on punaselt tähistatud regressioonijoon ja punktid tähistavad üksikuid proove. Paremal allnurgas on näidatud lineaarsete segaefektide mudeli tulemused.

2.4. Arutelu

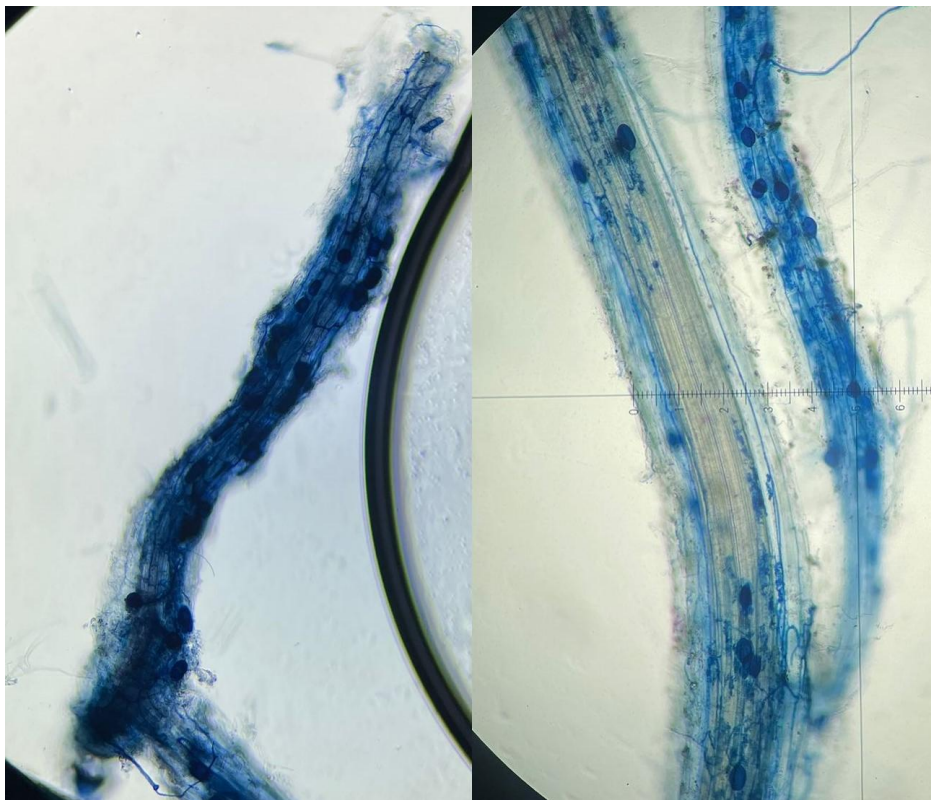
Nii vesiikulite, arbuskulite kui ka kogu kolonisatsiooni juurte mikroskopeerimise tulemuse ja PLFA 16:1ω5 kontsentratsiooni vahel oli statistiliselt oluline positiivne seos, mis ei sõltunud proovivõtu asukohast ega põllukultuurist. Seose tugevus erines olenevalt AM struktuurist, olles kõige tugevam kogu kolonisatsiooni ja kõige nõrgem arbuskulite puhul. See näitab, et nii PLFA kui mikroskopeerimise meetodid suudavad peegeldada reaalselt varieeruvust krohmseente ohtruses. Autori püstitatud hüpoteesid leidsid kinnitust.

PLFA 16:1ω5 kontsentratsioon ja AM kolonisatsiooni hindamine mikroskopeerimise teel ei räägi, hoolimata positiivsest seosest siiski täpselt sama lugu. Sellele viitab erinevus kogu kolonisatsiooni marginaalse ja konditsionaalse R^2 vahel. PLFA üksi seletab 10% AM variatsioonist, samas kui kogu mudel koos proovivõtukoha ja põllukultuuriga 62%. See tähendab, et PLFA hõlmab vaid väikse osa kogu AM kolonisatsiooni varieeruvusest ja mitmekesisusest. Seda saab põhjendada meetodite eri spetsiifikkatega. Fosfolipiidsed rasvhapped on hüüfide rakuseinte koostisosad ja seega on PLFA otseselt seotud krohmseente biomassiga (Schnürer jt., 1985). Mikroskopeerimine näitab aga kolonisatsiooni esinemise protsenti ja krohmseente ohtrust juurtes (Kokkoris jt., 2019). Seega pakuvad mõlemad meetodid pigem komplementaarset kui võrdväärset informatsiooni.

AM struktuuride (vesiikulite ja arbuskulite) kolonisatsiooni ja PLFA 16:1ω5 kontsentratsiooni vahel olevate seoste erinevus oli ootuspärane, olles vesiikulite puhul tugevam kui arbuskulite puhul. Vesiikulid on pikemaajalised varuainete, eriti lipiidide hoidlad, mistõttu seostuvad need hästi biomassiga ja on ka oma ehituse tõttu mikroskopeerides hästi märgatavad (Jabaji-Hare jt., 1984). Samas on arbuskulid vaid paaripäevase elueaga ning nende funktsiooniks on toitainete vahetamine (Smith ja Read, 2008). Lisaks on arbuskulid õrnad, kergesti lagunevad ja raskesti nähtavad. Seega võib nii juurte mikroskopeerimine raske nähtavuse ja PLFA kontsentratsiooni mõõtmise vähese biomassi tõttu arbuskulite ohtrust alahinnata.

AM kolonisatsioonide ja PLFA kontsentratsiooni vahelise suhte tugevus ei olenenud katseala asukohast ega taimeliigist, seega käesolevas töös need muutujad tulemusi ei mõjutanud. Kuna proovide arv kultuuri ja katseala asukoha kohta oli väike, on siiski võimalik, et PLFA ja vesiikulite vaheline seos oleneb asukohast või kultuurist, kuid selle tõestamiseks polnud piisavalt andmeid. Kui mullastikutingimused ja toitainete kättesaadavus oleksid katsealadel drastiliselt erinevad, oleksid ka nendes esinevad krohmseente liigid teistsugused ning tõenäoliselt sõltuksid mikroskopeerimise ja rasvhapete kontsentratsiooni tulemused asukohast. Lisaks võivad ka taimeliikide eri strateegiad, nende vastuvõtlikkus krohmseentele ja sümbioosi

loomine soodsate tingimuste korral mõjutada nii mikroskopeerimise kui rasvhapete mõõtmise tulemusi ja korrelatsiooni. Lisaks võivad mõne taimeliigi juured ja neis olevad AM struktuurid värvuda selgemini kui teistel liikidel, mis võib tulevastes uurimistöodes tulemusi mõjutada. Siinpuhul, võrreldes teiste katses kasvatatud taimedega olid oa juured jämedamad ning värvusid väga tumedalt (joonis 5), mis tegi kolonisatsiooni hindamise keeruliseks ja ajamahukaks. Probleemi võib lahendada oa juurte pikem KOH-ga töötlemine või lühem värvimisaeg. Tulevikus võiks enne suuremahulist värvimist läbi viia proovivärvimise kõikide mikroskopeeritavate taimeliikide juurtega ning vastavalt vajadusele kohandada protokoll.



Joonis 5. Trüpaansinisega värvumise erinevus eri taimeliikide puhul. Vasakul pildil oleva põldoa (*Vicia faba*) juur on värvunud tumedamalt kui paremal pildil oleva põldherne (*Pisum sativum*) juur. 400x suurendus. Fotode autor: Klaara Käämer 28.01.2025.

Mikroskopeerimise puhul on vastavalt valitud metoodikale omad head ja vead, mis on varasemalt töös välja toodud (tabel 1). Siiski on kõigil nendel meetoditel ka ühiseid üldiseid probleeme. Suurim neist on subjektiivsus, kuna hoolimata metoodikast oleneb kolonisatsiooni lugemise täpsus suuresti vaatlejast ja tema oskustest ning värvimistulemuse kvaliteedist. Võimalikult objektiivse tulemuse saavutamiseks peaks mikroskopeerimist läbi viima üks inimene, kuid sama saavutada meta-analüüsiks mitmete uurimuste vaheliselt on võimatu või ebamõistlik. Samuti oleneb juurtesisese kolonisatsiooni hindamise tulemus mikroskoobi alla sattuvast juuresegmendist, kuna AM pole juurestikus ühtlaselt levinud (Kokkoris jt., 2019), ja

nende koguarvust, mida peaks ideaalis olema soovitude kohaselt proovi kohta kuni 150 (Sun ja Tang, 2012). Samas tähendab 150 juuresegmenti üheksat mikroskoobislaidi proovi kohta, mis pole sageli kuluvat aega ja raha arvestades võimalik, seega piirduakse enamasti ühe slaidiga proovi kohta. Mikroskopeerimisel kasutatavad vahendid teevad kulu ühe proovi kohta odavaks, kuid seevastu kulub ühe proovi töötlemiseks olenevalt meetodist 10-60 minutit, seega ei sobi mikroskopeerimine suuremahulisteks projektideks. Eriti kui sisse arvestada inimlik viga ja väsimine, mistõttu päevas üle nelja tunni mikroskopeerimine mõjutab juba oluliselt tulemuste õigsust, mistõttu võtab ka tulemuste saamine üsna kaua aega. Kuna mikroskopeerimine näitab reaalselt juures esinevaid AM struktuure on see kõige otsesem elava ja reaalselt funktsioneeriva AM ohtruse hindamise meetod. Seega sobib see meetod kõige paremini sümbioosi, inokulantide efektiivsuse, taime toitainete omastamise ja juurekolonisatsiooni mõjutavate tegurite uurimiseks. Samas on nähtud ka tugevat korrelatsiooni AM kolonisatsiooni ja AM DNA-järjestuste vahel, ehk tinglikult võib ka meta-triipkoodistamine krohmseente ohtrust objektiivselt hinnata (Moora jt., 2016).

Kui üleüldiselt hinnata rasvhapete analüüsimise metoodikaid arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimisel, siis võib välja tuua mitmeid olulisi aspekte. Esmalt on oluline mõista, et ideaalset PLFA ja NLFA markerit AM määramiseks pole. PLFA 16:1 ω 5 on liialt üldine hõlmates ka Gram-negatiivseid baktereid (Zelles, 1997). Seetõttu tuleks just mullaproovides PLFAd mõõtes hinnata ka mittemükoriisete kontrollide abil taustal esinev PLFA (Olsson, 1999). Kusjuures ohtra mikroobikooslusega muldade puhul võib taustal esinev PLFA kogus olla AM kvantifitseerimiseks isegi liiga suur (Ngosong jt., 2012), muutes meetodi sobimatuks. Varasemalt on ka välja toodud, et 55% uuringuid kasutavad krohmseente kvantifitseerimisel PLFA-d sageli valesti, arvestamata taustal esinevaid fosfolipiideid rasvhappeid, mis võib viia valede tulemuste ja järeldusteni (Olsson ja Lekberg, 2022). Siiski ei peaks PLFA mõõtmisest hoiduma, kuna korrektsete kontrollproovide või hoopiski juureproovide kasutamise korral annab see, eriti NLFA-ga kombineeritult, infot krohmseente biomassi ja kasvu/varuainete suhte kohta (Olsson ja Lekberg, 2022). Kuigi vaid krohmseened toodavad NLFA 16:1 ω 5, esindab see marker vaid teatud levinumaid AM seltse (Graham jt., 1995; Olsson ja Lekberg, 2022). Neutraalsete rasvhapete abil AM kvantifitseerimise puhul tuleks esmalt selgeks teha uurimispaikade liigiline koosseis ning valida vastavalt esindatud seltsidele ka sobivad indikaatorlipiidid. Diskuteeritud on ka PLFA ja NLFA üldise sobivuse üle kvantifitseerimisel. Kuna NLFA-d seostatakse enim varuainete säilitamisega, on kahtluse all kui hästi suudab see kirjeldada üleüldist AM biomassi võrreldes PLFA-ga. Samas on nähtud, et NLFA 16:1 ω 5 on just dünaamilisem ja spetsiifilisem AM biomassi näitaja kui PLFA 16:1 ω 5. Sellele viitab

uuringus (Lekberg jt., 2022) tehtud võrdlus, kus mullaproovides vaid 30% mõõdetud PLFA 16:1 ω 5-st peegeldas aktiivselt kasvavavaid AM seeni. Ülejäänud 70% PLFA 16:1 ω 5-st moodustasid surnud, kuid lagunemata AM seened ja Gram-negatiivseid bakterid. Seevastu AM seened moodustasid keskmiselt 92% kogu NLFAst 16:1 ω 5 mullas. Samas polnud tehtud analüüs eriti täpne ning kindlamate järelduste tegemiseks on vaja täpsemalt analüüsida PLFA ja NLFA suhet ning võrrelda nende dünaamikat ja spetsiifilisust AM biomassi indikaatoritena. Kindlaks positiivseks küljeks rasvhapete analüüsil tasub mainida, et just väiksema ajakulu tõttu on see soodsam lahendus kui mikroskopeerimine, eriti suuremahuliste uurimuste puhul. Kuid proovid tuleb töötlusesse võtta üsna ruttu, kuna isegi külmutades väheneb PLFA kogus proovi kohta aastas üle 28% (Veum jt., 2019; Wu jt., 2009). Mullaproovidest rasvhapete kontsentratsioonide mõõtes saab hinnata ka juureväliseid hüüfe. AM seente ohtrust hinnates on oluline arvestada nii juuresisest ja juurevälist mütseeli, kuna erinevatel AM seeneliikidel on eri strateegiad, mis olenevad ka keskkonnast ja peremehest (Silva-Flores jt., 2019). Puhtalt juuresisese mütseeli hindamine, nagu see toimub juureproovide või juurte mikroskopeerimise korral, ei pruugi õigesti peegeldada AM seente rohkust või edukust, eriti nende liikide puhul, kes panustavad rohkem mullasisestesse kui juuresisestesse hüüfidesse.

Kokkuvõtteks võib nii katsest saadud info kui kirjandusest leitu põhjal teha paar üldist järeldust ja soovitus AM seente kvantifitseerimise meetodikate kasutamiseks. Juurte mikroskopeerimine annab infot juuresisese mükoriisa rohkuse ja talituse kohta ning rasvhapete kontsentratsioonide mõõtmine sisendit krohmseente biomassi kohta. Mullaproovidest PLFA mõõtmine peegeldab hästi AM biomassi ja NLFA, olles PLFA-st pisut dünaamilisem ning spetsiifilisem, näitab koos PLFA-ga lisaks ka krohmseente energiaseisundit ja metaboolselt aktiivsust. Juureproovide mikroskopeerimine näitab hästi just sümbioosi tegelikku olemust, seisundit ning võimaldab eristada krohmseente struktuure, mida rasvhapete analüüsid ei suuda. Samas on rasvhapete analüüsid objektiivsemad kui mikroskopeerimise meetodid. Seega üldise põllumajandusliku seire ja mulla tervise hindamiseks sobib lihtsuse, kiiruse, dünaamilisuse, hinna ning hea biomassi peegeldamise võime tõttu hästi NLFA kontsentratsioonide mõõtmine mullaproovidest. Ka PLFA mõõtmine sobib suuremahuliste uuringute korral, kuid siis tuleb mullaproovide puhul hoolega hinnata taustal esinevat PLFA kogust või võtta hoopis juureproove. Põhjalikumate tulemuste saamiseks ja täpsemate järelduste tegemiseks, eriti ökoloogiliste seoste uurimiseks, tuleks rasvhapete analüüsidele lisaks võtta ka juureproove, et mõõta mikroskopeerimise teel tegelikku kolonisatsiooni. Potikatsete puhul, eeldusel et proovide arv on pigem väiksem, annab palju infot PLFA ja juurte mikroskopeerimise kombinatsioon. Kuigi kõik meetodid on kohandatavad ja sobivad igasse konteksti tuleb meetodi

valikul arvestada kuluva aja, saadava info, olemasoleva ekspertiisi ja majanduslike vahenditega ning selle põhjal teha kaalutletud otsus.

Edaspidistes uuringutes samal teemal võiks uuringus kõrvutada nii meta-triipkoodistamist, juurte mikroskopeerimist, kolonisatsiooni ohtruse ja suurendusega mikroskopeerimise meetoditel, kui ka rasvhapete analüüsi, NLFA ja PLFA, juure ja mullaproovide puhul. Neid kõiki ka võimalusel eri mullastikutingimustel. Sellisel juhul saaks teha väga kindlaid järeldusi saadava informatsiooni ja meetodite korrelatsiooni kohta. See võimaldaks nii teadlastel kui ettevõtjatel teha krohmseente uurimismeetodi valimisel tõenduspõhine ja informeeritud valik ning vältida puhtalt metodoloogilisest valikust tulnud vigu.

KOKKUVÕTE

Krohmseened on olulised mullaelustiku liikmed nii looduslikes kui ka põllumajanduslikes kooslustes. Krohmseente kvantifitseerimine on vajalik sümbioosi olemuse ja funktsionaalsuse uurimiseks. Käesolevas töös võrreldi kahte peamist kvantifitseerimisel kasutatavat meetodit: fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi ja juurte mikroskopeerimist.

Bakalaureusetöö eesmärk oli teoreetilise tausta uurimise ja kahe meetodi regressioonianalüüsi läbi viies analüüsida fosfolipiidse rasvhape 16:1ω5 mõõtmise ja juurte mikroskopeerimise sobivust krohmseente kvantifitseerimisel ning esitada soovitusi meetodite kasutamiseks tulevastes töödes.

Arbuskulaarse mükoriisa arbuskulite, vesiikulite ja kogu kolonisatsiooni ning fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi vahel leiti statistiliselt oluline positiivne seos, mis ei sõltunud põllukultuuri liigist ega katseala asukohast. Siiski oli vesiikulite ja kogu kolonisatsioon rohkem PLFA 16:1ω5-ga seotud kui arbuskulite oma, mida saab põhjendada struktuuride eri rollide ja omadustega. Nimelt on vesiikulid varuainete hoidlad ning seostuvad hästi biomassiga, kuid arbuskulid vaid lühiealised toitainete vahetamisega tegelevad struktuurid. Kogu kolonisatsiooni ja PLFA 16:1ω5 marginaalse ning konditsionaalse R^2 vaheline erinevus näitab, et hoolimata meetodite positiivsest seosest annavad mõlemad pigem komplementaarset kui identset informatsiooni. Erinevus võib tulla meetodite spetsiifikast, kuna mikroskopeerimine näitab krohmseente kolonisatsiooni esinemise protsenti ja rasvhapped krohmseente biomassi.

Ühendades teoreetilistel ja empiirilistel andmetel põhinevad tulemused saab teha mitu soovitus tulevaste krohmseente seirete ja uurimuste läbiviimiseks. PLFA 16:1ω5 mõõtmine juure- ja mullaproovidest sobib suuremahulisteks projektideks, kuid just mullaproovide puhul tuleb tagada taustal esineva PLFA 16:1ω5 mõõtmine mitterühkide kontrollide näol. Juurte mikroskopeerimist tasub kasutada väiksemamahuliste ja ökoloogilisi tagamaid uurivate tööde puhul, suuremahulisteks uurimusteks on see ebamõistlik kuluva aja ja hinna tõttu.

Quantification of arbuscular mycorrhizae in root samples: comparison of phospholipid fatty acid analysis and root microscopy

Klaara Käämer

SUMMARY

Arbuscular mycorrhizal fungi are functionally important members of the soil biota in both natural and agricultural ecosystems. Their quantification in host plant roots is important for assessing the strength and the functional outcomes of the symbiosis. The aim of this study was to compare two widely used methods for quantifying arbuscular mycorrhiza: root colonization microscopy and phospholipid fatty acid analysis.

The theoretical part of this thesis examined the background of root colonization microscopy and phospholipid fatty acid analysis as methods for quantifying AM fungi in roots. The empirical part of this thesis evaluated the validity and similarity of the results provided by these two methods by testing their association with a regression analysis. In addition, recommendations are proposed for the application of these methods in future research and monitoring programs.

Concentration of the marker fatty acid PLFA 16:1 ω 5 was positively associated with total AM colonization as well as the percentage root length with arbuscules and vesicles. The relationship was independent of crop species and sampling location, indicating that the two methods give comparable results across different environmental and agricultural conditions. Vesicles and total AM colonization were stronger associated with PLFA 16:1 ω 5 concentration than arbuscules. This may be explained by the different biological roles and structural characteristics of these fungal components.

The large conditional R^2 compared to marginal R^2 in the models suggests that, despite the positive relationship, the methods provide complementary rather than identical information. This distinction arises from the methodological specificity of each approach: root microscopy measures the proportion of root length containing AM fungal structures, whereas PLFA 16:1 ω 5 concentration reflects fungal biomass. Consequently, the methods capture different aspects of mycorrhizal abundance and activity, making them suitable for different research purposes.

By combining the theoretical analysis with the results from the regression analysis, several recommendations and observations can be made for future monitoring and research studies. Due to the complementary nature of the methods they can be recommended to be used together

or combined with other quantification methods. In situations when time and resources are limited, it is important to consider which methods provides the kind of data that best matches the specific goals of the study. Measurement of PLFA 16:1 ω 5 is well suited for large-scale pot experiments; however, in soil sample analyses it is important to account for background levels of PLFA 16:1 ω 5 by including non-mycorrhizal control samples. Root microscopy is most appropriate for smaller-scale studies and research focusing on ecological interactions and mechanisms. For large-scale studies, however, the method becomes impractical due to the considerable time and financial costs involved.

TÄNUSÕNAD

Täna väga oma juhendajaid, et võtsite mind enda tiiva alla. Suur tänu Kaisale, et aitasid mind andmete analüüsiga, ilma sinuta ma oleks siiani koodiridade vahel lõksus. Aitäh, Inga, et aitasid minu töö fookust leida ja hoida ning sisendasid minusse usku, mis vahepeal kaduma läks. Aitäh, Jaak, et kontrollisid töö nõuetele vastavust, muidu oleksid paljud olulised detailid jäänud parandamata.

Suur tänu ka Ayeshile, kes tegi fosfolipiidsete rasvhapete analüüsid. Lisaks tänan ka Teaduse tippkeskust "Agroökoloogia ja uued kultuurid tulevikukliimas" ja Maaelu Teadmuskeskust, ilma teie projektideta poleks mul millestki kirjutada.

Aitäh kursakaaslastele ja sõpradele, kes te mulle iga päev nõu ja jõuga toeks olite.

- Aarle, I. M. van, and Olsson, P. A. (2008). Resource Partitioning Between Extraradical and Intraradical AM Fungal Mycelium. *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics* (Third edition, lk 321–336). Springer Berlin Heidelberg.
- Abbott, L. K., and Lumley, S. (2014). Assessing Economic Benefits of Arbuscular Mycorrhizal Fungi as a Potential Indicator of Soil Health. Z. M. Solaiman, L. K. Abbott, and A. Varma (Toim), *Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Land Restoration* (lk 17–31). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45370-4_2
- Ahmed, E., and Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., and Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824–827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>
- Alteio, L. V., Séneca, J., Canarini, A., Angel, R., Jansa, J., Guseva, K., Kaiser, C., Richter, A., and Schmidt, H. (2021). A critical perspective on interpreting amplicon sequencing data in soil ecological research. *Soil Biology and Biochemistry*, 160, 108357. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108357>
- Arruda, B., Rodrigues, Y. F., Herrera, W. F. B., Robin, A., Cotta, S. R., and Andreote, F. D. (2022). Experimental validation under controlled conditions of real time PCR to quantify arbuscular mycorrhizal colonization in root. *Journal of Microbiological Methods*, 192, 106382. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106382>
- Asghari, H. R., and Cavagnaro, T. R. (2011). Arbuscular mycorrhizas enhance plant interception of leached nutrients. *Functional Plant Biology*, 38(3), 219–226. <https://doi.org/10.1071/FP10180>
- Augé, R. M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 11(1), 3–42. <https://doi.org/10.1007/s005720100097>
- Bago, B., Pfeffer, P. E., and Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124(3), 949–958. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.949>

- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1).
<https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Beilby, J. P. (1980). Fatty acid and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora laevis*. *Lipids*, 15(11), 949–952.
<https://doi.org/10.1007/BF02534420>
- Berger, F., and Gutjahr, C. (2021). Factors affecting plant responsiveness to arbuscular mycorrhiza. *Current Opinion in Plant Biology, Growth and development 2021*, 59, 101994. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.101994>
- Bergmann, J., Weigelt, A., van der Plas, F., Laughlin, D. C., Kuyper, T. W., Guerrero-Ramirez, N., Valverde-Barrantes, O. J., Bruehlheide, H., Freschet, G. T., Iversen, C. M., Kattge, J., McCormack, M. L., Meier, I. C., Rillig, M. C., Roumet, C., Semchenko, M., Sweeney, C. J., van Ruijven, J., York, L. M., and Mommer, L. (2020). The fungal collaboration gradient dominates the root economics space in plants. *Science Advances*, 6(27), eaba3756. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba3756>
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.-C., Roux, C., Bécard, G., and Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*, 4(7), e226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040226>
- Blanke, V., Renker, C., Wagner, M., Füllner, K., Held, M., Kuhn, A. J., and Buscot, F. (2005). Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonization of *Artemisia vulgaris* in a phosphate-polluted field site. *New Phytologist*, 166(3), 981–992.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01374.x>
- Błaszowski, J., Sánchez-García, M., Niezgoda, P., Zubek, S., Fernández, F., Vila, A., Al-Yahya'ei, M. N., Symanczik, S., Mileczarski, P., Malinowski, R., Cabello, M., Goto, B. T., Casieri, L., Malicka, M., Bierza, W., and Magurno, F. (2022). A new order, Entrophosporales, and three new Entrophospora species in Glomeromycota. *Frontiers in Microbiology*, 13, 962856. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962856>
- Bodenhause, N., Deslandes-Hérolde, G., Waelchli, J., Held, A., van der Heijden, M. G. A., and Schlaeppi, K. (2021). Relative qPCR to quantify colonization of plant roots by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 31(2), 137–148.
<https://doi.org/10.1007/s00572-020-01014-1>
- Burri, K., Gromke, C., and Graf, F. (2013). Mycorrhizal fungi protect the soil from wind erosion: A wind tunnel study. *Land Degradation and Development*, 24(4), 385–392.
<https://doi.org/10.1002/ldr.1136>

- Cole, J., Raguideau, S., Abbaszadeh-Dahaji, P., Hilton, S., Muscatt, G., Mushinski, R. M., Nilsson, R. H., Ryan, M. H., Quince, C., and Bending, G. D. (2025). Comparative genomic analysis of a metagenome-assembled genome reveals distinctive symbiotic traits in a Mucoromycotina fine root endophyte arbuscular mycorrhizal fungus. *BMC Genomics*, 26(1), 967. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-12149-w>
- Cordier, C., Pozo, M. J., Barea, J. M., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V. (1998). Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 11(10), 1017–1028. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.10.1017>
- Corona Ramírez, A., Symanczik, S., Gallusser, T., and Bodenhausen, N. (2023). Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi root colonization in wheat, tomato, and leek using absolute qPCR. *Mycorrhiza*, 33(5), 387–397. <https://doi.org/10.1007/s00572-023-01122-8>
- Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort, C., Renard, L., Strullu, D.-G., and Declerck, S. (2005). Methodologies for in Vitro Cultivation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with Root Organs. S. Declerck, J. A. Fortin, and D.-G. Strullu (Toim), *In Vitro Culture of Mycorrhizas* (1k 341–375). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-27331-X_18
- Cruz, C., Egsgaard, H., Trujillo, C., Ambus, P., Requena, N., Martins-Loução, M. A., and Jakobsen, I. (2007). Enzymatic Evidence for the Key Role of Arginine in Nitrogen Translocation by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology*, 144(2), 782–792. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090522>
- Daniels, B. A., and Skipper, H. A. (1982). Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research* (1k 29–35). American Phytopathological Society.
- Davison, J., Moora, M., Öpik, M., Adholeya, A., Ainsaar, L., Bâ, A., Burla, S., Diedhiou, A. G., Hiiesalu, I., Jairus, T., Johnson, N. C., Kane, A., Koorem, K., Kochar, M., Ndiaye, C., Pärtel, M., Reier, Ü., Saks, Ü., Singh, R., ... Zobel, M. (2015). Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349(6251), 970–973. <https://doi.org/10.1126/science.aab1161>
- de Carvalho, C. C. C. R., and Caramujo, M. J. (2018). The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(10), 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>

- Driver, J. D., Holben, W. E., and Rillig, M. C. (2005). Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(1), 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.06.011>
- Evelin, H., Kapoor, R., and Giri, B. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: A review. *Annals of Botany*, 104(7), 1263–1280. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp251>
- Fox, J., Weisberg, S., and Price, B. (2001). *car: Companion to Applied Regression* (1k 3.1-5) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.car>
- Francis, R., and Read, D. J. (1994). The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant and Soil*, 159(1), 11–25. <https://doi.org/10.1007/BF00000091>
- Frostegård, Å., Tunlid, A., and Bååth, E. (1991). Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*, 14(3), 151–163. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90018-L](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90018-L)
- Frostegård, A., Tunlid, A., and Bååth, E. (1993). Phospholipid Fatty Acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3605–3617. <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3605-3617.1993>
- Gamper, H. A., Young, J. P. W., Jones, D. L., and Hodge, A. (2008). Real-time PCR and microscopy: Are the two methods measuring the same unit of arbuscular mycorrhizal fungal abundance? *Fungal Genetics and Biology*, 45(5), 581–596. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.09.007>
- Gerdemann, J. W., and Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Dumas-Gaudot, E., Franken, P., and Gianinazzi, S. (1994). Gene Expression and Molecular Modifications Associated with Plant Responses to Infection by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. M. J. Daniels, J. A. Downie, and A. E. Osbourn (Toim), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions: Vol. 3 Proceedings of the 7th International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions, Edinburgh, U.K., June 1994* (1k 179–186). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0177-6_27
- Gianinazzi-Pearson, V., Morandi, D., Dexheimer, J., and Gianinazzi, S. (1981). Ultrastructural and ultracytochemical features of a *Glomus tenuis* mycorrhiza. *New Phytologist*, 88(4), 633–639. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb01739.x>

- González-Chávez, M. C., Carrillo-González, R., Wright, S. F., and Nichols, K. A. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 130(3), 317–323.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.004>
- Govindasamy, P., Muthusamy, S. K., Bagavathiannan, M., Mowrer, J., Jagannadham, P. T. K., Maity, A., Halli, H. M., G. K., S., Vadivel, R., T. K., D., Raj, R., Pooniya, V., Babu, S., Rathore, S. S., L., M., and Tiwari, G. (2023). Nitrogen use efficiency—A key to enhance crop productivity under a changing climate. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1121073. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1121073>
- Graham, J. H., Hodge, N. C., and Morton, J. B. (1995). Fatty Acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 58–64. <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.58-64.1995>
- Hause, B., Mrosk, C., Isayenkov, S., and Strack, D. (2007). Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry, Molecular Basics of Mycorrhizal Symbiosis*, 68(1), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.025>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., and deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hodge, A., and Fitter, A. H. (2010). Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13754–13759.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005874107>
- Hodge, A., and Storer, K. (2015). Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: Implications for individual plants through to ecosystems. *Plant and Soil*, 386(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1007/s11104-014-2162-1>
- Jabaji-Hare, S., Deschene, A., and Kendrick, B. (1984). Lipid Content and Composition of Vesicles of a Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Mycologia*, 76(6), 1024–1030. <https://doi.org/10.1080/00275514.1984.12023946>
- Jiang, S., An, X., Shao, Y., Kang, Y., Chen, T., Mei, X., Dong, C., Xu, Y., and Shen, Q. (2021). Responses of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Occurrence to Organic Fertilizer: A meta-analysis of field studies. *Plant and Soil*, 469(1–2), 89–105.
<https://doi.org/10.1007/s11104-021-05153-y>

- Johansen, A., Finlay, R. D., and Olsson, P. A. (1996). Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 133(4), 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb01939.x>
- Joutey, N. T., Sayel, H., Bahafid, W., and El Ghachtouli, N. (2015). Mechanisms of Hexavalent Chromium Resistance and Removal by Microorganisms. D. M. Whitacre (Toim), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 233* (1k 45–69). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10479-9_2
- Kabir, Z. (2005). Tillage or no-tillage: Impact on mycorrhizae. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(1), 23–29. <https://doi.org/10.4141/P03-160>
- Kobae, Y., Kameoka, H., Sugimura, Y., Saito, K., Ohtomo, R., Fujiwara, T., and Kyoizuka, J. (2018). Strigolactone Biosynthesis Genes of Rice are Required for the Punctual Entry of Arbuscular Mycorrhizal Fungi into the Roots. *Plant and Cell Physiology*, 59(3), 544–553. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy001>
- Koch, A. M., Antunes, P. M., Maherali, H., Hart, M. M., and Klironomos, J. N. (2017). Evolutionary asymmetry in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Conservatism in fungal morphology does not predict host plant growth. *New Phytologist*, 214(3), 1330–1337. <https://doi.org/10.1111/nph.14465>
- Kohout, P., Sudová, R., Janoušková, M., Čtvrtlíková, M., Hejda, M., Pánková, H., Slavíková, R., Štajerová, K., Vosátka, M., and Sýkorová, Z. (2014). Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.027>
- Koide, R. T., and Mosse, B. (2004). A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, 14(3), 145–163. <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0307-4>
- Kokkoris, V. (2026). Mycelial dynamics in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 249(2), 691–713. <https://doi.org/10.1111/nph.70688>
- Kokkoris, V., Pogiatis, A., and Hart, M. M. (2019). Contrasting common measures of arbuscular mycorrhizal fungal root colonization. *Journal of Microbiological Methods*, 167, 105727. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105727>
- Koske, R. E., and Gemma, J. N. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas.
- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., and Schüßler, A. (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist*, 193(4), 970–984. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x>

- Kumar, A., Kumar, R., Singh, P., Kalaichelvan, S., Santos-Villalobos, S. de los, Kumar, N., Fernando, L., Kumar, R., Solanki, M. K., Joshi, N. C., and Babalola, O. O. (2025). Emerging Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Sustainable Agriculture: From Biology to Field Application. *MicrobiologyOpen*, 14(5), e70082. <https://doi.org/10.1002/mbo3.70082>
- Köhl, L., Lukasiewicz, C. E., and van der Heijden, M. G. A. (2016). Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant, Cell and Environment*, 39(1), 136–146. <https://doi.org/10.1111/pce.12600>
- Lamb, P. D., Hunter, E., Pinnegar, J. K., Creer, S., Davies, R. G., and Taylor, M. I. (2019). How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. *Molecular Ecology*, 28(2), 420–430. <https://doi.org/10.1111/mec.14920>
- Lambers, H., and Teste, F. P. (2013). Interactions between arbuscular mycorrhizal and non-mycorrhizal plants: Do non-mycorrhizal species at both extremes of nutrient availability play the same game? *Plant, Cell and Environment*, 36(11), 1911–1915. <https://doi.org/10.1111/pce.12117>
- Lekberg, Y., Bååth, E., Frostegård, Å., Hammer, E., Hedlund, K., Jansa, J., Kaiser, C., Ramsey, P. W., Řezanka, T., Rousk, J., Wallander, H., Welc, M., and Olsson, P. A. (2022). Fatty acid 16:1 ω 5 as a proxy for arbuscular mycorrhizal fungal biomass: Current challenges and ways forward. *Biology and Fertility of Soils*, 58(8), 835–842. <https://doi.org/10.1007/s00374-022-01670-9>
- Lutzoni, F., Nowak, M. D., Alfaro, M. E., Reeb, V., Miadlikowska, J., Krug, M., Arnold, A. E., Lewis, L. A., Swofford, D. L., Hibbett, D., Hilu, K., James, T. Y., Quandt, D., and Magallón, S. (2018). Contemporaneous radiations of fungi and plants linked to symbiosis. *Nature Communications*, 9(1), 5451. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07849-9>
- Lynch, J. P., Ho, M. D., and phosphorus, L. (2005). Rhizoeconomics: Carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant and Soil*, 269(1), 45–56. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1096-4>
- Mai, W., Xue, X., Feng, G., Yang, R., and Tian, C. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi – 15-Fold enlargement of the soil volume of cotton roots for phosphorus uptake in intensive planting conditions. *European Journal of Soil Biology*, 90, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2018.12.002>
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., and 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.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>
- Miller, R. M., Jastrow, J. D., and Reinhardt, D. R. (1995). External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia*, 103(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/BF00328420>
- Moora, M., Öpik, M., Davison, J., Jairus, T., Vasar, M., Zobel, M., & Eckstein, R. L. (2016). AM fungal communities inhabiting the roots of submerged aquatic plant *Lobelia dortmanna* are diverse and include a high proportion of novel taxa. *Mycorrhiza*, 26(7), 735–745.
- Moreno Jiménez, E., Ferrol, N., Corradi, N., Peñalosa, J. M., and Rillig, M. C. (2024). The potential of arbuscular mycorrhizal fungi to enhance metallic micronutrient uptake and mitigate food contamination in agriculture: Prospects and challenges. *New Phytologist*, 242(4), 1441–1447. <https://doi.org/10.1111/nph.19269>
- Mulyadi, and Jiang, L. (2023). Combined Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Nitrogen Fertilizer Alters the Physicochemical Soil Properties, Nitrogen Uptake, and Rice Yield in a Polybag Experiment. *Agriculture*, 13(7), 1364. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071364>
- Müller, M. M., Kantola, R., and Kitunen, V. (1994). Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycological Research*, 98(6), 593–603. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80404-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80404-8)
- Newman, E. I. (1966). A Method of Estimating the Total Length of Root in a Sample. *Journal of Applied Ecology*, 3(1), 139–145. <https://doi.org/10.2307/2401670>
- Ngosong, C., Gabriel, E., and Ruess, L. (2012). Use of the Signature Fatty Acid 16:1 ω 5 as a Tool to Determine the Distribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Soil. *Journal of Lipids*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/236807>
- Nicolson, T. H. (1955). *The mycotrophic habit in grass* [Doctoral dissertation]. University of Nottingham.
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., and Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(Database issue), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Oehl, F. (2026). Three new orders and five new families in the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi of the Glomeromycetes class in the phylum Glomeromycota. *Sydowia An International Journal of Mycology*, 233–258.

- Ohyaama, T. (2010). *Nitrogen as a major essential element of plants*. (lk 1–18).
- Olsson, P. A. (1999). Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 29(4), 303–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00621.x>
- Olsson, P. A., and Johansen, A. (2000). Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. *Mycological Research*, 104(4), 429–434. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001410>
- Olsson, P. A., and Lekberg, Y. (2022). A critical review of the use of lipid signature molecules for the quantification of arbuscular mycorrhiza fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 166, 108574. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108574>
- Pagano, M. C., Kyriakides, M., and Kuyper, T. W. (2023). Effects of Pesticides on the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Agrochemicals*, 2(2), 337–354. <https://doi.org/10.3390/agrochemicals2020020>
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Phillips, J. M., and Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-IN18. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Posit team. (2026). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (Version 2026.01.0.392) [Software]. Posit Software, PBC. <https://www.posit.co/>
- Qian, S., Xu, Y., Zhang, Y., Wang, X., Niu, X., and Wang, P. (2024). Effect of AMF Inoculation on Reducing Excessive Fertilizer Use. *Microorganisms*, 12(8), 1550. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081550>
- R Core Team. (2025). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* Author: (Version 4.5.2) [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., and Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Redecker, D., Kodner, R., and Graham, L. E. (2000). Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486), 1920–1921. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1920>

- Rillig, M. C., Wright, S. F., Nichols, K. A., Schmidt, W. F., and Torn, M. S. (2001). Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil*, 233(2), 167–177. <https://doi.org/10.1023/A:1010364221169>
- Ropars, J., Toro, K. S., Noel, J., Pelin, A., Charron, P., Farinelli, L., Marton, T., Krüger, M., Fuchs, J., Brachmann, A., and Corradi, N. (2016). Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature Microbiology*, 1(6), 16033. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.33>
- Rosendahl, S. (2008). Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178(2), 253–266. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02378.x>
- Rosling, A., Eshghi Sahraei, S., Kalsoom Khan, F., Desirò, A., Bryson, A. E., Mondo, S. J., Grigoriev, I. V., Bonito, G., and Sánchez-García, M. (2024). Evolutionary history of arbuscular mycorrhizal fungi and genomic signatures of obligate symbiosis. *BMC Genomics*, 25(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10391-2>
- Salvioli di Fossalunga, A., and Novero, M. (2019). To trade in the field: The molecular determinants of arbuscular mycorrhiza nutrient exchange. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0150-7>
- Sato, T., Hachiya, S., Inamura, N., Ezawa, T., Cheng, W., and Tawarayama, K. (2019). Secretion of acid phosphatase from extraradical hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* is regulated in response to phosphate availability. *Mycorrhiza*, 29(6), 599–605. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00923-0>
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schnürer, J., Clarholm, M., and Rosswall, T. (1985). Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(5), 611–618. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90036-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90036-7)
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

- Schutter, M. E., and Dick, R. P. (2000). Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Methods for Characterizing Microbial Communities. *Soil Science Society of America Journal*, 64(5), 1659–1668. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.6451659x>
- Schüßler, A., and Walker, C. (2010). (PDF) *The Glomeromycota*. The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/285775809_The_Glomeromycota
- Shah, S., Nawaz, T., and Fahad, S. (2025). Arbuscular mycorrhizal fungi role in plant beneficial elements uptake and nutrient acquisition. *Rhizosphere*, 35, 101141. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2025.101141>
- Sharma, M. P., and Buyer, J. S. (2015). Comparison of biochemical and microscopic methods for quantification of arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots. *Applied Soil Ecology*, 95, 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.001>
- Silva-Flores, P., Bueno, C. G., Neira, J., and Palfner, G. (2019). Factors Affecting Arbuscular Mycorrhizal Fungi Spore Density in the Chilean Mediterranean-Type Ecosystem. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19(1), 42–50. <https://doi.org/10.1007/s42729-018-0004-6>
- Smith, S. E., and Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed). Academic Press.
- Song, Y. Y., Zeng, R. S., Xu, J. F., Li, J., Shen, X., and Yihdego, W. G. (2010). Interplant Communication of Tomato Plants through Underground Common Mycorrhizal Networks. *PLOS ONE*, 5(10), e13324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013324>
- Sparling, and Tinker. (1975). Mycorrhizas in Pennine Grassland. *Endomycorrhizas*, 545–560.
- Stockinger, H., Krüger, M., and Schüßler, A. (2010). DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 187(2), 461–474. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x>
- Stürmer, S. L., Bever, J. D., and Morton, J. B. (2018). Biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota): A phylogenetic perspective on species distribution patterns. *Mycorrhiza*, 28(7), 587–603. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0864-6>
- Sun, X.-G., and Tang, M. (2012). Comparison of four routinely used methods for assessing root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Botany*, 90(11), 1073–1083. <https://doi.org/10.1139/b2012-084>
- Zelles, L. (1997). Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere, Experimental and Theoretical Approaches in*

Environmental Chemistry, 35(1), 275–294. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00155-0)

- Zhang, T., Yang, X., Guo, R., and Guo, J. (2016). Response of AM fungi spore population to elevated temperature and nitrogen addition and their influence on the plant community composition and productivity. *Scientific Reports*, 6, 24749. <https://doi.org/10.1038/srep24749>
- Zhou, J., Bilyera, N., Guillaume, T., Yang, H., Li, F.-M., and Shi, L. (2024). Microbial necromass and glycoproteins for determining soil carbon formation under arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Science of The Total Environment*, 955, 176732. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176732>
- Zobel, M., Koorem, K., Moora, M., Semchenko, M., and Davison, J. (2024). Symbiont plasticity as a driver of plant success. *New Phytologist*, 241: 2340-2352. <https://doi.org/10.1111/nph.19566>
- Tawaray, K., Hirose, R., and Wagatsuma, T. (2012). Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi can substantially reduce phosphate fertilizer application to *Allium fistulosum* L. and achieve marketable yield under field condition. *Biology and Fertility of Soils*, 48(7), 839–843. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0669-2>
- Tedersoo, L., Magurno, F., Alkahtani, S., and Mikryukov, V. (2024). Phylogenetic classification of arbuscular mycorrhizal fungi: New species and higher-ranking taxa in Glomeromycota and Mucoromycota (class Endogonomycetes). *MycKeys*, 107, 273–325. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.107.125549>
- Tester, M., Smith, S. E., and Smith, F. A. (1987). The phenomenon of „nonmycorrhizal“ plants. *Canadian Journal of Botany*, 65(3), 419–431. <https://doi.org/10.1139/b87-051>
- Trouvelot, A. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un systeme racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle (Osa 217-221). *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*.
- Turland, N. J., Wiersema, J. H., Barrie, F. R., Gandhi, K. N., Gravendyck, J., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Klopfer, R. R., Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, D.-Z., May, T. W., Monro, A. M., Prado, J., Price, M. J., Smith, G. F., and Señoret, J. C. Z. (2025). *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants: 2025 Edition, Madrid Code*. University of Chicago Press. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226839479.001.0001>
- Vahter, T., Sepp, S.-K., Astover, A., Helm, A., Kikas, T., Liu, S., Oja, J., Öpik, M., Penu, P., Vasar, M., Veromann, E., Zobel, M., and Hiiesalu, I. (2022). Landscapes, management practices and their interactions shape soil fungal diversity in arable fields – Evidence

- from a nationwide farmers' network. *Soil Biology and Biochemistry*, 168, 108652.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108652>
- Van Aarle, I. M., and Olsson, P. A. (2003). Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6762–6767.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6762-6767.2003>
- van der Heijden, M. G. A. (2010). Mycorrhizal fungi reduce nutrient loss from model grassland ecosystems. *Ecology*, 91(4), 1163–1171. <https://doi.org/10.1890/09-0336.1>
- Vance, C. P., Uhde-Stone, C., and Allan, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157(3), 423–447. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x>
- Verzeaux, J., Nivellet, E., Roger, D., Hirel, B., Dubois, F., and Tetu, T. (2017). Spore Density of Arbuscular Mycorrhizal Fungi is Fostered by Six Years of a No-Till System and is Correlated with Environmental Parameters in a Silty Loam Soil. *Agronomy*, 7(2), 38.
<https://doi.org/10.3390/agronomy7020038>
- Veum, K. S., Lorenz, T., and Kremer, R. J. (2019). Phospholipid Fatty Acid Profiles of Soils under Variable Handling and Storage Conditions. *Agronomy Journal*, 111(3), 1090–1096. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.09.0628>
- Voříšková, A., Jansa, J., Püschel, D., Krüger, M., Cajt.haml, T., Vosátka, M., and Janoušková, M. (2017). Real-time PCR quantification of arbuscular mycorrhizal fungi: Does the use of nuclear or mitochondrial markers make a difference? *Mycorrhiza*, 27(6), 577–585. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0777-9>
- Wahab, A., Muhammad, M., Munir, A., Abdi, G., Zaman, W., Ayaz, A., ... and Reddy, S. P. P. (2023). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in regulating growth, enhancing productivity, and potentially influencing ecosystems under abiotic and biotic stresses. *Plants*, 12(17), 3102.
- Walker, C., and Vestberg, M. (1998). Synonymy Amongst the Arbuscular Mycorrhizal Fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstenum* and *G. fistulosum*. *Annals of Botany*, 82(5), 601–624. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0714>
- Wehner, J., Antunes, P. M., Powell, J. R., Mazukatow, J., and Rillig, M. C. (2010). Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia*, 53(3), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2009.10.002>
- Whipps, J. M. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1198–1227.
<https://doi.org/10.1139/b04-082>

- White, D. C., Davis, W. M., Nickels, J. S., King, J. D., and Bobbie, R. J. (1979). Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia*, 40(1), 51–62. <https://doi.org/10.1007/BF00388810>
- Wijayawardene, N., Hyde, K., Dai, D., Sánchez-García, M., Goto, B., Saxena, R., Erdoğan, M., Selçuk, F., Rajeshkumar, K., Aptroot, A., Błaszowski, J., Boonyuen, N., Da Silva, G., De Souza, F., Dong, W., Ertz, D., Haelewaters, D., Jones, E., Karunarathna, S., ... Thines, M. (2022). Outline of Fungi and fungus-like taxa – 2021. *Mycosphere*, 13(1), 53–453. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/2>
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Mikhailov, K. V., Péter, G., Aptroot, A., Pires-Zottarelli, C. L. A., Goto, B. T., Tokarev, Y. S., Haelewaters, D., Karunarathna, S. C., Kirk, P. M., de A. Santiago, A. L. C. M., Saxena, R. K., Schoutteten, N., Wimalasena, M. K., Aleoshin, V. V., Al-Hatmi, A. M. S., Ariyawansa, K. G. S. U., Assunção, A. R., ... Karpov, S. A. (2024). Classes and phyla of the kingdom Fungi. *Fungal Diversity*, 128(1), 1–165. <https://doi.org/10.1007/s13225-024-00540-z>
- Wilkes, T. I. (2023). Alternative inks for arbuscular mycorrhizal root staining. *Access Microbiology*, 5(8), acmi000618.v4. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000618.v4>
- Wright, S. F., and Upadhyaya, A. (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 198(1), 97–107. <https://doi.org/10.1023/A:1004347701584>
- Wu, Y., Chen, C., and Wang, G. (2024). Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves plant biomass and nitrogen and phosphorus nutrients: A meta-analysis. *BMC Plant Biology*, 24(1), 960. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05638-9>
- Wu, Y., Ding, N., Wang, G., Xu, J., Wu, J., and Brookes, P. C. (2009). Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses. *Geoderma*, 150(1–2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.02.003>
- Wältermann, M., and Steinbüchel, A. (2005). Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure, Formation, and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3607–3619. <https://doi.org/10.1128/jb.187.11.3607-3619.2005>
- Öpik, M., Metsis, M., Daniell, T. J., Zobel, M., and Moora, M. (2009). Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist*, 184(2), 424–437. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x>

- Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J. M., Reier, Ü., and Zobel, M. (2010). The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 188(1), 223–241. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x>
- Yu, W., Gao, H., and Kang, H. (2021). Ester Linked Fatty Acid (ELFA) method should be used with caution for interpreting soil microbial communities and their relationships with environmental variables in forest soils. *PLOS ONE*, 16(5), e0251501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251501>

Kasutatud veebiaadressid:

<https://metk.agri.ee/vaetamise-abc> (Vaadatud 15.03.2026)

https://food.ec.europa.eu/system/files/2020-05/f2f_action-plan_2020_strategy-info_en.pdf

(Vaadatud 18.04.2026)

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Klaara Käämer,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „Arbuskulaarse mükoriisa kvantifitseerimine juureproovides: fosfolipiidsete rasvhapete analüüsi ja juurte mikroskopeerimise meetodite võrdlus”, mille juhendajad on Inga Hiiesalu-Vahter, Kaisa Anneli Torppa, Jaak Truu, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõigusekehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Klaara Käämer,

25.05.2026