

Tartu Ülikool
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut



BIOMARKER-RASVHAPETEL PÕHINEVA PÕLLUMULDADE BIOLOOGILISE SEISUNDI INDIKAATORI VÄLJATÖÖTAMINE UURINGU ARUANNE

Koostasid:

Tanel Vahter, PhD (projektijuht, vastutav täitja)

Siim-Kaarel Sepp, PhD (projekti põhitäitja)

Kontakt

Tartu Ülikool

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Botaanika osakond

Tel: T.Vahter: +372 522 7841

e-post: [tanel.vahter\(at\)ut.ee](mailto:tanel.vahter@ut.ee)



Projekt on valminud Maaeluministeeriumi tellimusel lepingu 142 raames.

Tööde läbiviija: Tartu Ülikool

Tööde läbiviimise aeg: 10.06.2021 – 9.12.2022

Projekti elluviimisel osalesid Tartu Ülikooli ökoloogia ja maateaduste instituudi botaanika osakonna teadlased, kraadiõppurid ning Põllumajandusuuringute Keskuse töötajad:

Tartu Ülikool

Tanel Vahter, PhD

Siim-Kaarel Sepp, PhD

Inga Hiiesalu, PhD

Martti Vasar, PhD

Prof. Maarja Öpik, PhD

Ayesh Piyara Wipulasena, MSc, doktorant

Siqiao Liu, MSc, doktorant

Mirjam Vösaste, MSc

Põllumajandusuuringute Keskus

Priit Penu, MSc

Evelin Pihlap, PhD

Virgo Rääts, MSc

Tambet Kikas, MSc

Aare Papp, BSc

Aruandele tuleks viidata järgnevalt:

Vahter, T., Sepp, S-K., Hiiesalu, I., Vasar, M., Öpik, M., Wipulasena, A.P., Liu, S., Vösaste, M., Penu, P., Pihlap, E., Rääts, V., Kikas, T., Papp, A. 2022. Biomarker-rasvhapetel põhineva põllumuldade bioloogilise seisundi indikaatori väljatöötamine - uuringu aruanne. Koostatud Maaeluministeeriumile lepingu nr 142 raames. Tartu Ülikool, Ökoloogia ja Maateaduste Instituut.

SISUKORD

1	Uuringu eesmärk.....	5
1.1	Uuringu lähteülesanne.....	6
2	Uuringu metoodika	8
2.1	Uurimisalade valik 2019	8
2.2	Uurimisalade valik 2021	8
2.3	Mullaproovide kogumine	9
2.3.1	Proovide kogumine välitöödel	10
2.4	Laboratoorsed analüüsid	11
2.4.1	Mulla agrokeemiliste parameetrite määramine	11
2.4.2	Molekulaarsed analüüsid	11
2.4.3	Mulla biomarker-rasvhapete analüüs	12
2.5	Statistilised analüüsid	14
3	Tulemused.....	17
3.1	Tulemused – üldmõõdikud.....	18
3.1.1	Üldmõõdikud – molekulaaranalüüsid	19
3.1.2	Üldmõõdikud – mulla biomarker-rasvhapped	21
3.2	Tulemused – mulla mikroobikooslused	23
3.3	Tulemused – mullaelustiku parameetrite ajaline dünaamika	25
3.3.1	Ajaline dünaamika – üldmõõdikud	25
3.3.2	Ajaline dünaamika – mikroobikooslused.....	28
3.4	Seosed mulla agrokeemiliste parameetritega	30
3.5	Tulemuste kokkuvõte	34
3.6	Tulemuste massiivipõhise esituse lahendus	37
3.6.1	Koodi kasutamine	39
4	Metoodikate rakendatavuse hinnang.....	40

4.1	Rakendatavus – molekulaarne mullaorganismide tuvastamine	40
4.2	Rakendatavus – mulla biomarker-rasvhapete analüüs	44
4.3	Metoodikate võrdlus.....	47
4.4	Nõuded mullaproovide kogumiseks ja säilitamiseks	51
5	Soovitused indikaatori edasiarenduseks	53
6	Integratsioon riikliku mullaseirega	56
7	Kokkuvõte.....	58
8	Summary	61
	Kirjandusviited.....	65
	Lisa 1 – Analüüsiprotokoll mulla seene-elustiku molekulaarseks määramiseks.....	70
	Lisa 2 – Analüüsiprotokoll mulla mikroobikoosluse biomasside määramiseks biomarker-rasvhapete analüüsil (96 proovi).....	77
	Lisa 3 – Uuringu käigus toodetud andmete seletuskiri	87
	Lisa 4 – Tulemuste massiivipõhise esituse lahenduse lähtekood	89
	Lisa 5 – Mullaproovide kogumise metoodika	104
	Lisa 6. Tulemuste levitamise kava.....	106

1 UURINGU EESMÄRK

"Põllumajanduse ja kalanduse valdkonna arengukava aastani 2030" (PõKa) hetkeolukorra kirjelduses (ptk 3.1.3.) on toodud, et Eestis on seni vähe teadmisi põllumuldade bioloogilisest seisundist. Sellest tulenevalt on PõKa ptk-s 3.1.5. „Riigi sekkumine tulevikus eesmärkide täitmiseks“ toodud, et tuleb tegema hakata mulla bioloogilise seisundi seiret.

Mullaproove võetakse ja neid analüüsitakse praegu riiklikult põllumajanduspoliitika kujundamiseks ning põllumajandustootjate tasandil majandamisotsuste tegemiseks.

Põllumuldade riiklik seire on osa riiklikust keskkonnaseirest, kus muldade bioloogilise seisundi seire on seni piirdunud üksikutel aastatel hooghännaliste ja vihmausside seirel erinevate majandamispraktikate lõikes, mille tulemus sõltus aga väga olulisel määral seireaegsest ilmast.

https://www.keskkonnaagentuur.ee/sites/default/files/mullaseire_allprogramm_0.docx

Lisaks riiklikule keskkonnaseirele viib Põllumajandusuuringute Keskus (PMK) läbi mitmesuguseid mullavaldkonna uuringuid, mille eesmärk on põllumajandustootjate majandamispraktikate ja põllumajandustootjate mõju hindamise kaudu aidata kaasa Eesti põllumajanduspoliitika kujundamisele: <https://pmk.agri.ee/et/pollumajanduskeskkonna-uuringud/uurimisvaldkonnad/muld>

Seni ei ole need uuringud mulla bioloogilist seisundit pidevalt hinnanud. PMK on näiteks lisaks eelpool mainitud vihmaussi- ja hooghännaliste koosluste hindamisele hinnanud otsekülvi uuringu raames ka mulla üldist bioloogilist aktiivsust. Samas ei ole uuringuid, kuidas eri majandamispraktikad mullaelustikku mõjutavad. Põllumajandustootjate hulgas muutub mullaproovide võtmine üha populaarsemaks ning peamiselt agrokeemiliste analüüside tulemuste ja väetamissoovitustega arvestatakse asjakohaste praktikate valikul.

Mullaproovide võtmist ja analüüsimist toetatakse ka mitmete Eesti maaelu arengukava põllumajanduslike keskkonnatoetuste kaudu, millega on liitunud suurem osa põllumajandustootjatest ning seetõttu võiks nimetatud analüüse nimetada ka massanalüüsideks.

Seni puudub põllumajandustootjatel aga massanalüüside tasemel võimalus oma muldade bioloogilise seisundi kohta infot saada. Teise praktilise probleemina ei ole veel piisavalt infot, kuidas saadud andmeid interpreteerida.

Kuna Eestis puudub piisav ülevaade põllumuldade bioloogilisest seisundist, pärsib nende andmete puudumine asjakohase põllumajanduspoliitika kujundamist ning põllumajandustootjatel majandamisotsuste langetamist. Ühtlasi on pärsitud põllumajandus-valdkonna strateegiliste eesmärkide saavutamine. Seire läbiviimist on seni takistanud asjakohase mõõdiku ja andmete kogumise metoodika (sh andmete interpreteerimine) puudumine ning selle probleemi lahendamisele projekt kaasa aitab.

1.1 Uuringu lähteülesanne

Uuringu eesmärgiks on välja töötada Eesti muldade seisundit võimalikult täpselt iseloomustav(ad) mullaelustiku ja -elurikkuse mõõdik(ud) ning ka selle esialgne interpreteerimine. Käesoleva töö tulemusena on loodud alused Eesti muldade seisundi ja elurikkuse jätkusuutlikuks ja võimalikult mitmeplaaniliseks hindamiseks. Lisaks soovime näha ka ettepanekuid valdkonna edasiseks arendamiseks ja jätkuprojektide käivitamiseks.

Erinevate mulla mikroorganismide rakustruktuurides kasutatakse organismide põhifunktsioonide tagamiseks erinevaid rasvhappeid. Neid rasvhappeid mullast eraldades ning analüütiliselt määrates on võimalik suuremate rühmade kaupa eristada seente, mükoriisat moodustavate seente, erinevate bakterite ning aktinomütsetide suhtelised biomassid. Biomarker-rasvhapete analüüsi järgselt profileeritakse mulla mikrobiom, mida saab edaspidi kasutada muldade seisundi hindamise protsessis. Antud uuringus võrreldakse biomarker-rasvhapete meetodit nukleiinhapete tuvastamisel põhinevate meetoditega. Eesmärgiks on saada parim võimalik metoodika muldade mikrobiomi ja eluvõime hindamiseks.

Uuringus toetutakse KIK projekti nr 15499 “Põllumajandusliku maakasutuse mõju mullaelustikule: seened mulla bioloogilise seisundi indikaatorina” raames kogutud andmestikule ning muuhulgas kasutatakse analüüsideks seal kogutud mullaproove. Projekti käigus võetakse vaatluse alla ka muud asjassepuutuvad uuringud, doktoritööd ja projektid, millega meeskond on olnud seotud või millest on teadlik. Projektil on väga oluline rakenduslik mõju. Projekti

tulemusena valitud meetoditest tulenevate kvalitatiivsete ja kvantitatiivsete andmete kogumisvõimekus (ning kogumine) aitab riiklikul tasandil kaasa teadmispõhise poliitika kujundamisele (üks PõKa eesmärkidest) ning põllumajandustootja tasandil keskkonnahoidlike majandamisotsuste tegemisele.

2 UURINGU METOODIKA

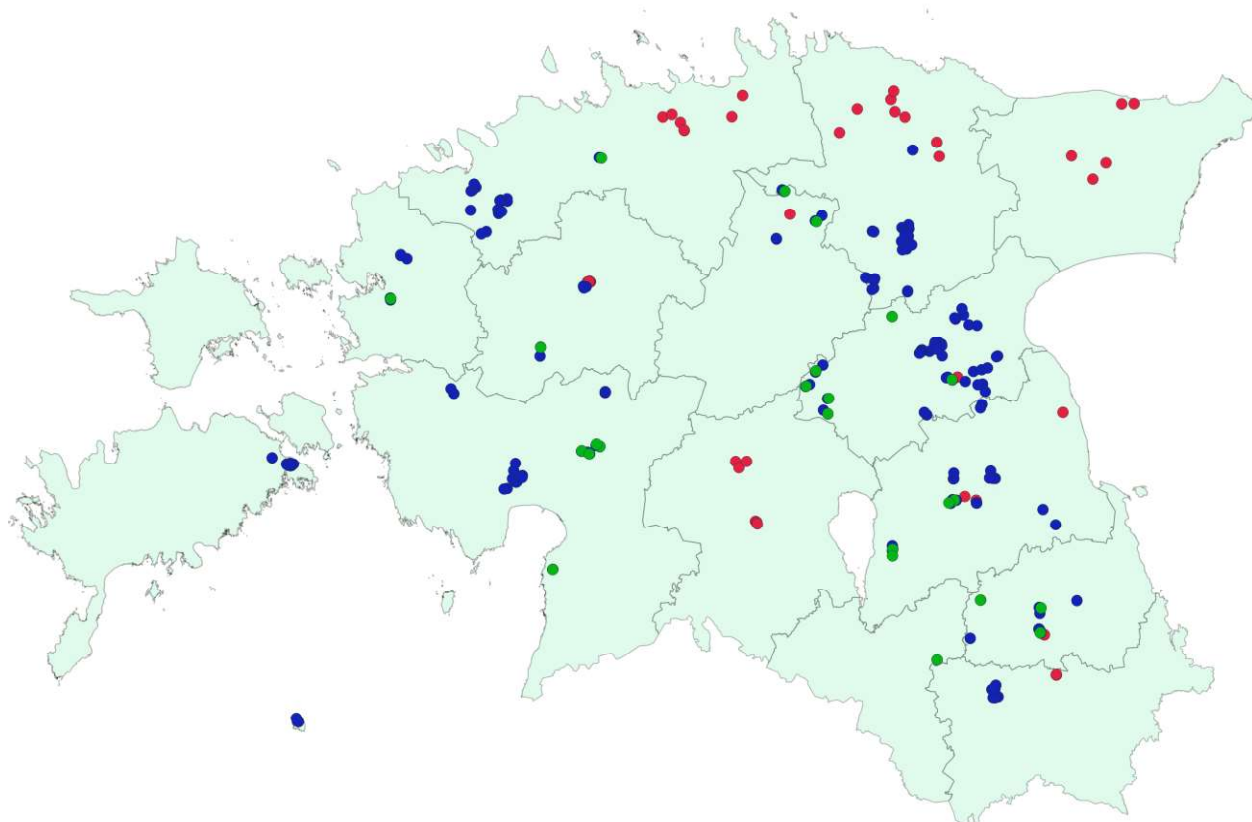
2.1 Uurimisalade valik 2019

Uurimisalade valimisel lähtuti põhimõttest, et põllumassiivid peavad olema aktiivses kasutuses, kasvatama külvikorras teravilju, olema proovivõtu aastal eelistatavalt teravilja all. Teravilja eelistati, kuna proovivõtu aastal kasvatatava kultuuri mõju ei olnud võimalik ette ennustada ning see võimaldas piirata kultuuri mõjust tingitud variatsiooni. Ühtlasi on teraviljad ka pindalaliselt Eestis olulisemad. Püsirohumaid kasutati läbi viidud uuringus referentsina, kirjeldamaks, milline võiks olla mullaseente elurikkus sarnastes keskkonnatingimustes juhul kui massiiv pole intensiivses külvikorras.

Uuringualad paiknevad Eesti olulisemates põllumajanduspiirkondades ning väljendavad seega ka põllumajandusliku maakasutuse mõistes olulisemaid alasid. Uuringu tingimustele vastas küsitluse tulemusena 139 põllumassiivi ning 79 püsirohumaad. Proovialade paiknemine on kujutatud Joonisel 1.

2.2 Uurimisalade valik 2021

Täiendavate proovide kogumisel 2021. aastal keskenduti 2019. aastal ebapiisavalt esindatud piirkondadele. Kriteeriumid proovialade valikuks olid samad, mis 2019. aastal, kuid seekord kitsendati valikut vaid teravilja kasvatavatele põllumassiividele Harjumaal, Lääne- ja Ida-Virumaal ning Viljandimaal. 51 mullaproovi koguti uutelt, varem külastamata aladelt; 24 mullaproovi koguti riikliku mullaseire püsialadelt. Proovialade paiknemine on kujutatud Joonisel 1. Alade jaotus maakasutuse, viljelusviisi ja proovide kogumise aasta järgi on esitatud Tabelis 1.



Joonis 1. Proovialade paiknemine. Siniste sümbolitega on kujutatud 2019. aasta proovialad (218), punaste sümbolitega 2021. aasta proovialad (51), roheliste sümbolitega riikliku mullaseire alad, kus koguti proovid mõlemal aastal (24, sisalduvad 2019. aasta proovide arvus).

Tabel 1. Proovialade jaotus aastate, maakasutuse ja viljelusviiside kaupa.

	2019		2021		Kahel aastal kokku	
	Püsirohumaad	Põllud	Püsirohumaad	Põllud	Püsirohumaad	Põllud
Mahe	33	35	1	3	34	38
Tava	46	104	4	67	50	171
Kokku	79	139	5	70	84	209

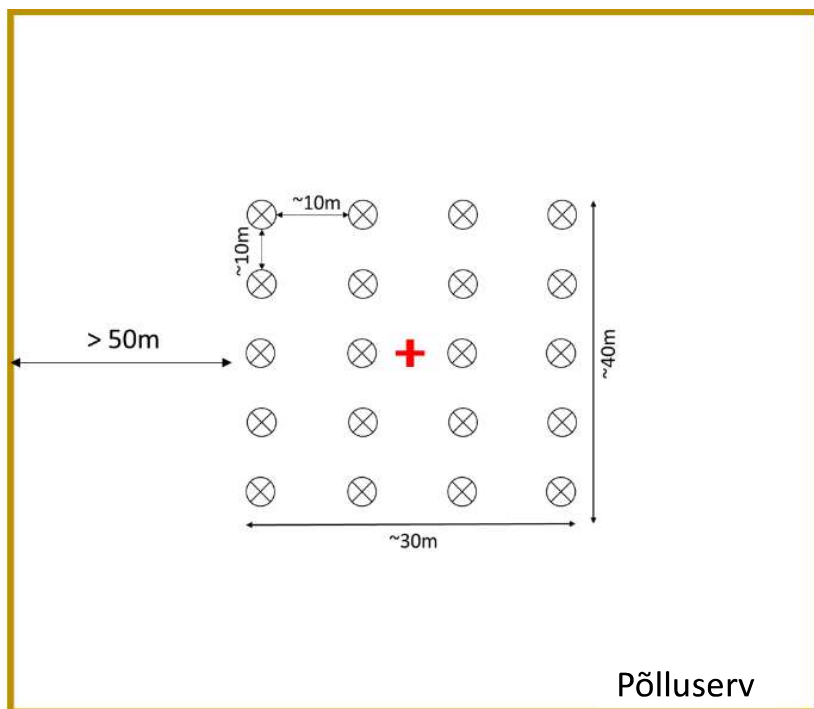
2.3 Mullaproovide kogumine

Taimede fenoloogiast lähtuvalt on mullaelustiku analüüsi proovide kogumiseks sobivaim kultuuride valmimise ja koristamise aeg. Nii nagu taimedele, on ka mullaelustikule omane nii liigirikkuse kui biomassi variatsioon vegetatsiooniperioodi lõikes. Kogudes mullaproovid

vegetatsiooniperioodi nn kliimaksstaadiumil, suurendatakse tõenäosust, et enamik koosluses olevaid seeneliike on suutnud oma elutsükliks piisaval hulgal biomassi kasvatada ning on seeläbi molekulaarsete analüüsidega tuvastatavad. Olulisemat mõju omab proovide kogumise aeg eeskätt haruldasemate ja väikese biomassiga liikide jaoks, kes näiteks kevadise proovivõtuga ei pruugi analüüsitulemustes kajastuda. Samuti on oluline võimalikult pikk vahe väetamistöödega, mis võimaldab hinnata mulla tegelikku seenekooslust, mitte aga väetise laotamisest tingitud lühiajalisi muutusi. Nendest faktoritest tulenevalt koguti põhiline osa proovidest perioodil juulist septembrini. 2019. aastal koguti proovid Tartu Ülikooli teadlaste, 2021. aastal Põllumajandusuuringute Keskuse töötajate poolt.

2.3.1 Proovide kogumine välitöödel

Mullaproovid koguti välitöödel ühtse metoodika alusel. Samaaegselt koguti proov nii molekulaarseteks analüüsideks kui ka mulla biomarker-rasvhapete kontsentratsioonide ja agrookeemiliste parameetrite määramiseks. Mullaproov koguti põllu mõttelisest keskkohast või suuremate massiivide puhul vähemalt 50m kauguselt põllu servast, et vähendada võimaliku servaeefekti mõju analüüsitulemustele. Mullaproov koosnes 20 üksikproovist, mis koguti umbes 30×40 m alalt (Joonis 2). Üksikproovid koguti mullapuuriga 0~20cm sügavuselt steriilsesse soonkinnisega kilekotti. Üksikproovid segati kotis hoolikalt ning seejärel koguti sealt steriilseid vahendeid kasutades kolm 10g replikaatproovi mullaelustiku DNA-põhisteks analüüsideks, kolm 10g replikaatproovi mulla biomarker-rasvhapete analüüsiks ning umbes 500g mulda agrookeemilisteks analüüsideks. Molekulaarseteks ja biomarker-rasvhapete analüüsideks võetud proovid kuivatati, kasutades silikageeli, mis võimaldab proovide kiiret ja saastumisohuta kuivatamist juba samal päeval. Proovide kiire kuivatamine on oluline, kuivõrd niiskes mullas toimuvad bioloogilised protsessid edasi ka pärast proovivõttu, muutes mulla mikrobioloogilist kooslust. Agrookeemilisteks analüüsideks võetud proovid kuivatati enne Põllumajandusuuringute Keskuse agrookeemia laborisse saatmist toatemperatuuril õhu käes.



Joonis 2. Mullaproovi kogumise skeem. 20 üksikproovi segati üheks koguprooviks, millest koguti materjal nii molekulaarseteks kui ka agrookeemilisteks analüüsideks.

2.4 Laboratoorsed analüüsid

2.4.1 Mulla agrookeemiliste parameetrite määramine

Agrookeemilised analüüsid teostati Põllumajandusuuringute Keskuse agrookeemia laboratooriumis. Mullaproovidest analüüsitud parameetrid olid pH (KCl), orgaaniline süsinik (sulfokroom-oksüdatsioon e Tjurini meetod), fosfori ja kaaliumisisaldus (Mehlich III ekstraheeruv).

2.4.2 Molekulaarsed analüüsid

Mullaproovidest DNA eraldamiseks kasutati DNeasy PowerMax Soil Kit (Qiagen) komplekte. DNA eraldamisel lähtuti mõnede modifikatsioonidega (kirjeldatud Gazol et al., 2016) [tootjapoolsest juhendist](#). Erinevalt tootjapoolsest protokollist eraldati DNA kümne grammi mulla asemel viiest grammist mullast. Samuti kasutati tootjapoolsest protokollist erinevalt pärast C1 lahuse (detergendi) lisamist nii inkubatsiooni kui töötlust vorteksil. Need modifikatsioonid

suurendavad varasemate kogemuste põhjal DNA saagist ning vähendavad polümeraasi ahelreaktsioonis inhibiitorite hulka.

Amplikonipõhine polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) ning sekveneerimine viidi läbi biotehnoloogiaettevõttes Asper Biogene OÜ (Tartu, Eesti).

DNA ekstraktide kontsentratsioone sekveneerimiseks ettevalmistusel ei ühtlustatud. See võimaldab kasutada sekveneerimisel saadud lugemite arvu ka liikide suhtelise ohtruse hinnanguna. Esimene PCR reaktsioon viidi läbi amplikonipõhiste praimeritega: üldseente praimerid: fITS7_o, fITS7 ja ITS4 (Kohout et al., 2014; Lekberg et al., 2018; White et al., 1990) ITS regioonile. Pärast esimest PCR reaktsiooni puhastati produktid ning viidi läbi teine PCR Illumina Nextera XT indeks-adapteritega. Pärast teist PCR reaktsiooni produktid puhastati ning koondati raamatukogudesse. Valmis raamatukogud laeti Illumina Miseq 2 x 250bp (üldseened) kiipidele ning sekveneeriti Miseq sekvenaatoril.

Järjestustele viidi läbi kvaliteedikontroll ning puhastus, kasutades selleks uurimisrühmas välja töötatud töövoogu. Saadud sekventse võrreldi avaliku andmebaasiga UNITE (Abarenkov et al., 2010, Nilsson et al., 2018) kõigi seente määramiseks. Molekulaarselt defineeritud liikide puhul kasutatakse andmebaasi põhimõtetest tulenevalt nimetust liigihüpotees (LH). Kuna andmebaas on kureeritud, vastab liigihüpotees ligikaudu liigi tasemel taksonile ning edaspidi kasutatakse neid mõisteid sünonüümselt.

Põhjalikum molekulaaranalüüside ja bioinformaatilise andmetöötamise metoodika on esitatud Lisas 1.

Lisaks liigimäärangule jagati üldseente praimeritega määratud liigid ka funktsionaalseteks rühmadeks FungalTraits (Põlme, et al., 2020) andmebaasi abil. Eristati sümbiotroofsed krohmseened (AM seened) ning saprotroofse (kõdulagundajad) ja patotroofse (patogeenid) eluviisi esindajad.

2.4.3 Mulla biomarker-rasvhapete analüüs

Mulla biomarker-rasvhapete analüüs viidi läbi kõikidele 2019, ja 2021 aastal kogutud mullaproovidele (293 proovi), kasutades klassikalise Bligh ja Dyer ekstraktsiooni ja leeliselise metanolüüsi modifitseeritud protokoll (Wipulasena, 2021). Modifikatsioonid ei muuda

põhimõtteliselt protsessi keemiat, kuid võimaldavad rasvhapete derivatiseerimist läbi viia 96 kaevuga mikroplaatidel, suurendades oluliselt meetoodika läbilaskevõimet. Põhjalik meetoodika kirjeldus on esitatud Lisa 2, kuid lühidalt oli töökäik järgmine:

Kasutatava protokoll järgi eraldatakse mullast kahe-etapilise Bligh ja Dyer lahusega ekstraheerimise tulemusena rasvhapped. Järgmises etapis fraktsioneeritakse eraldatud rasvhapped polaarsuse järgi erinevateks rasvhapete klassideks – neutraalsed lipiidid (NLFA), glükolipiidid (ei säilitata) ja fosfolipiidsed rasvhapped (PLFA). Edasistes sammudes derivatiseeritakse rasvhapped kerge aluselise metanolüüsiga (transesterdamine) rasvhapete metüülestriteks, mis võimaldab nende analüüsimist gaasikromatograafil leek-ionisatsiooni detekteerimise meetodil. Kromatogrammidele arvutatakse huvipakkuvate rasvhapete molaarsisaldused võrdluses proovidesse lisatud sisestandardiga. Olenevalt kasutatava kromatograafia meetoodika spetsiifikast võib kromatogrammidele tuvastada kuni kolmkümmend erineva indikaatorväärtusega marker-rasvhapet (Frostegård et al., 1993; Frostegård & Bååth, 1996; Olsson et al., 1999; Olsson & Johansen, 2000; van Aarle & Olsson, 2003; Lekberg et al., 2022, Tabel 2). Käesolevas uuringus kasutati PLFA 18:2 ω 6,9 rasvhapet üldseente ja NLFA 16:1 ω 5 krohmseente biomassi indikaatoritena. Bakteriaalse biomassi indikaatoritena kasutati markerite i15:0, a15:0, i16:0, a17:0, 17:0, 10Me17:0, 10Me18:0 ja cy19:0 summat. Individuaalsete indikaator-rasvhapete sisaldused esitatakse üldjuhul nanomoolides grammi mulla kohta. On võimalus tulemused konverteerida ka massiühikutesse, kuid kuna individuaalsete rasvhapete molaarmassid on erinevad, vähendab see tulemuste tõlgendamisel intuitiivset arusaamist ning enamasti seda ei tehta. Lisaks on rasvhapete biomarkerite sisaldused suhtelised, mitte absoluutsed – erinevad organismirühmad on oma rasvhapete kogusisalduselt erinevad, mistõttu ei tohiks omavahel absoluutväärtustes võrrelda näiteks seente ja bakterite rasvhapetel põhinevaid biomasse.

Tabel 2. Biomarker-rasvhapped ja nende indikatiivsus organismirühmiti.

Organismirühm	Rasvhapped	Allikas
Kõik organismid	12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0	[1]
Bakterid	i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, cy19:0, 16:1 ω 7, 17:1 ω 9, 18:1 ω 7	[2]
Gram-positiivsed bakterid	i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0	[1, 2]
Gram-negatiivsed bakterid	cy17:0, 16:1 ω 7, 18:1 ω 7, 17:1 ω 9	[2]
Aktinomütseedid	10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0	[1, 2]
Seened	18:2 ω 6,9	[2]
Krohmseened (AM)	16:1 ω 5	[3]

[1] Hedrick et al., 2005; [2] Moore-Kucera & Dick, 2008; [3] Olsson et al., 1999

2.5 Statistilised analüüsid

Hindamaks põllumassiivi tüübi (püsirohuma või põld), viljelusviisi (tava- või maheviljelus) ja mulla orgaanilise süsiniku mõju mullaelustiku DNA-põhisele elurikkusele ning biomarker-rasvhapatepõhisele biomassile, kasutati geograafilisel kaugusel põhinevat korrelatsiooni-struktuuri arvesse võtvaid lineaarseid segamõjudega mudeleid (*lme()* R-i paketi *nlme*, Pinheiro et al., 2021), kus sõltuvaks tunnuseks oli kas seente erinevate funktsionaalsete rühmade DNA-põhine liigirikkus (liigihüpoteeside arv) või erinevate mullaelustiku rühmade biomass (mh seente ja bakterite biomasside naturaallogaritmide suhe). Põllumassiivi tüübi mõju hindamisel kaasati lisaks tüübile seletavate tunnustena mudelisse naturaallogaritmide mulla orgaanilise süsiniku sisaldus, mulla keemiliste parameetrite peakomponentanalüüsi kaks esimest peakomponenti ja proovivõtuaasta. Viljelusviisi ja mulla orgaanilise süsiniku sisalduse mõju hindamisel kasutati ainult põldudelt võetud proove sisaldavat osaandmestikku; seletavate tunnustena kaasati mudelisse lisaks viljelusviisile ja orgaanilise süsiniku sisaldusele ka mullakeemia kaks esimest peakomponenti ja proovivõtu aasta ning juhusliku muutujana proovivõtuaastal põllul kasvanud kultuur. Mulla keemiliste parameetrite kaasamiseks mudelitesse rakendati muutujatevahelise kollineaarsuse vältimiseks eelnevalt peakomponentanalüüsi (*prcomp()* R paketi *stats*), kuhu kaasati naturaallogaritmide mulla fosfori- ja kaaliumisisaldus ning mulla pH, mis enne

peakkomponentanalüüsi standarditi. Edasistes analüüsidesse kaasatud kaks esimest peakomponenti kirjeldasid kokku 84% kolme eelmainitud mulla keemilise parameetri variatsioonist, kusjuures esimene peakomponent oli võrdelises seoses mulla fosfori- ja kaaliumisisaldusega ning teine peakomponent pöördvõrdelises seoses mulla pH-ga. Mulla keemiliste parameetrite peakomponendid kaasati mudelitesse nii lineaar- kui ruutliikmena. Seega oli mudeli struktuur järgmine (mahe ja tavaviljeluse võrdluse näitel):

lme(liigirikkus või biomass ~ tava_mahe + log(OrgC) + poly(mullakeemia.pc1, degree = 2) + poly(mullakeemia.pc2, degree = 2) + aasta, juhuslik = ~ 1|kultuur, correlation = corHaversine(form = ~lon + lat, mimic = "corSpher")), kus *corHaversine* funktsiooniga antakse mudelile ruumilise autokorrelatsiooni arvestamiseks proovialade geograafilisel kaugusel põhinev korrelatsioonistruktuur.

Seletavate tunnuste marginaalse mõju olulisuse hindamiseks segamõjuga mudelite puhul kasutati tõepärafunktsioonide võrdlemisel põhinevat *Wald*'i testi (*anova.lme()* R paketi *nlme*).

Hindamaks põllumassi tüübi või viljelusviisi mõju mullaelustiku koosluse koosseisule, kasutati kauguspõhist liiasusanalüüsi (*distance-based redundancy analysis*; *dbrda()* R paketi *vegan*, Oksanen et al., 2020), kus sõltuvaks tunnuseks olev kooslusemaatriks oli proovi sekveneerimissügavuse mõju eemaldamiseks eelnevalt läbinud dispersiooni stabiliseeriva transformatsiooni (*variance stabilizing transformation*; *varianceStabilizingTransformation()* R paketi *DESeq2*, Love et al., 2014). Liiasusanalüüsi kaasati lisaks meid huvitavale sõltuvale tunnusele ka naturaalogaritmitud mulla orgaanilise süsiniku sisaldus, mulla keemiliste parameetrite esimesed kaks peakomponenti ning proovivõtuaasta. Seletavate tunnuste marginaalse mõju olulisuse hindamiseks kasutati dispersioonanalüüsilaadset permutatsioonitesti (*ANOVA like permutation test*; *anova.cca()* R paketi *vegan*).

Kahel proovivõtuaastal samalt põllumassiivilt võetud proovide vahelise ajalise variatsiooni hindamiseks elurikkusele või biomassile kaasati lineaarsesse segamudelisse seletavate tunnustena lisaks proovivõtuaastale ka viljelusviisi, naturaalogaritmitud mulla orgaanilise süsiniku sisaldus ja mulla keemiliste parameetrite kaks esimest peakomponenti ning juhusliku muutujana põllumassiivi kood. Mõju olulisuse hindamiseks kasutati *Wald*'i testi. Koosluse koosseisu aastatevahelise variatsiooni hindamiseks kasutati Prokrustese ordinatsioonidevahelise

korrelatsiooni hindamise analüüsi (*Procrustes analysis*; *protest()* R paketi vegan), mõju olulisust hinnati permutatsioonitestiga.

DNA-põhise elurikkuse ja rasvhapetepõhise biomassi omavahelist korrelatsiooni hinnati Pearsoni korrelatsioonikordajaga (*cor.test()* R paketi stats).

Kõik statistilised analüüsid viidi läbi keskkonnas R (v4.2.1; R Core Team, 2021)

3 TULEMUSED

Aruande tulemuste peatükis esitatakse molekulaarselt määratud seente elurikkuse ja biomarker-rasvhapete analüüsi tulemusel saadud mulla mikroobikoosluse näitajad. Peamiselt keskendutakse nn üldmõõdikutele, mis kirjeldavad kummagi analüüsimetodiga saadud tulemusi püsirohumaadel ja põldudel, mahe ja tavaviljeluses ning mulla orgaanilise süsiniku sisaldusest lähtuvalt. Esitatavate analüüsides eesmärk ei ole interpreteerida tulemusi Eesti põllumajanduse kontekstis, st anda hinnangut viljelusviisidele, vaid kirjeldada kasutatud meetodite informatiivsust erinevates maakasutussüsteemides.

Lähtuvalt projekti eesmärkidest esitatakse 24 prooviala põhjal ka kahel proovivõtu aastal kogutud proovide tulemuste ajaline dünaamika, pidades peaaegselt silmas meetodikate kasutussobivust seireks. Kuna kahe mullaproovide kogumise etapi vahele jäi vaid kaks vegetatsiooniperioodi, ei eelda uuringu koostajad aastate-vahelisi majandamisviisidest lähtuvaid märkimisväärsed muutusi proovivõtualade muldade mikroobikoosluste üldises seisundis. Seega peegeldavad saadud tulemused pigem looduslikest ja kliimatilistest teguritest tingitud variatsiooni mullaelustiku parameetrites ning ei ole informatiivsed mullaelustiku seisundi trendide osas.

Tulemuste tõlgendamisel tuleb arvestada maakasutuse ja viljelusviiside ebaühtlase jaotumisega proovide kogumise aastate vahel – suurem osa 2021. aastal kogutud proovidest pärineb külvikorras olevatelt tavaviljeluse põldudelt, mistõttu võivad aastate-vahelised tulemuste erinevused mõjutada ka statistilisi analüüse ja nende põhjal tehtavaid järeldusi.

Viimaks kirjeldatakse analüüsitud parameetrite massiivipõhise esitusviisi üht võimalikku lahendust. Esitatakse lahenduse ülevaatlilik tehniline kirjeldus ning olulised aspektid lahenduse rakendamiseks. Rõhutame, et esitatud lahendus ei ole informatiivne seire otstarbel, kus olulisemad on ülevaatlilikud aegread, vaid kujutab endast võimalikku infokandjat juhuanalüüsidel põllumajandustootjale.

3.1 Tulemused – üldmõõdikud

Mudelite parameetrite statistilised hinnangud koos olulisuse hinnangutega on esitatud Tabelis 3. Individuaalsete analüüsitulemuste tutvustamisel järgnevates alapeatükkides lähenetakse paralleelselt nii metoodika kui eesmärgipõhiselt.

Tabel 3. Analüüsitud mudelite tulemused parameetrite koefitsientidega. Tüüp-Põld näitab, kui palju on põldude elurikkus või biomass suurem (või miinusbiljoni puhul väiksem) rohumaadest; Viljelusviis-Tavaviljelus näitab kui palju on tavaviljeluse korral võrreldes maheviljelusega elurikkus või biomass suurem (või miinusbiljoni puhul väiksem).

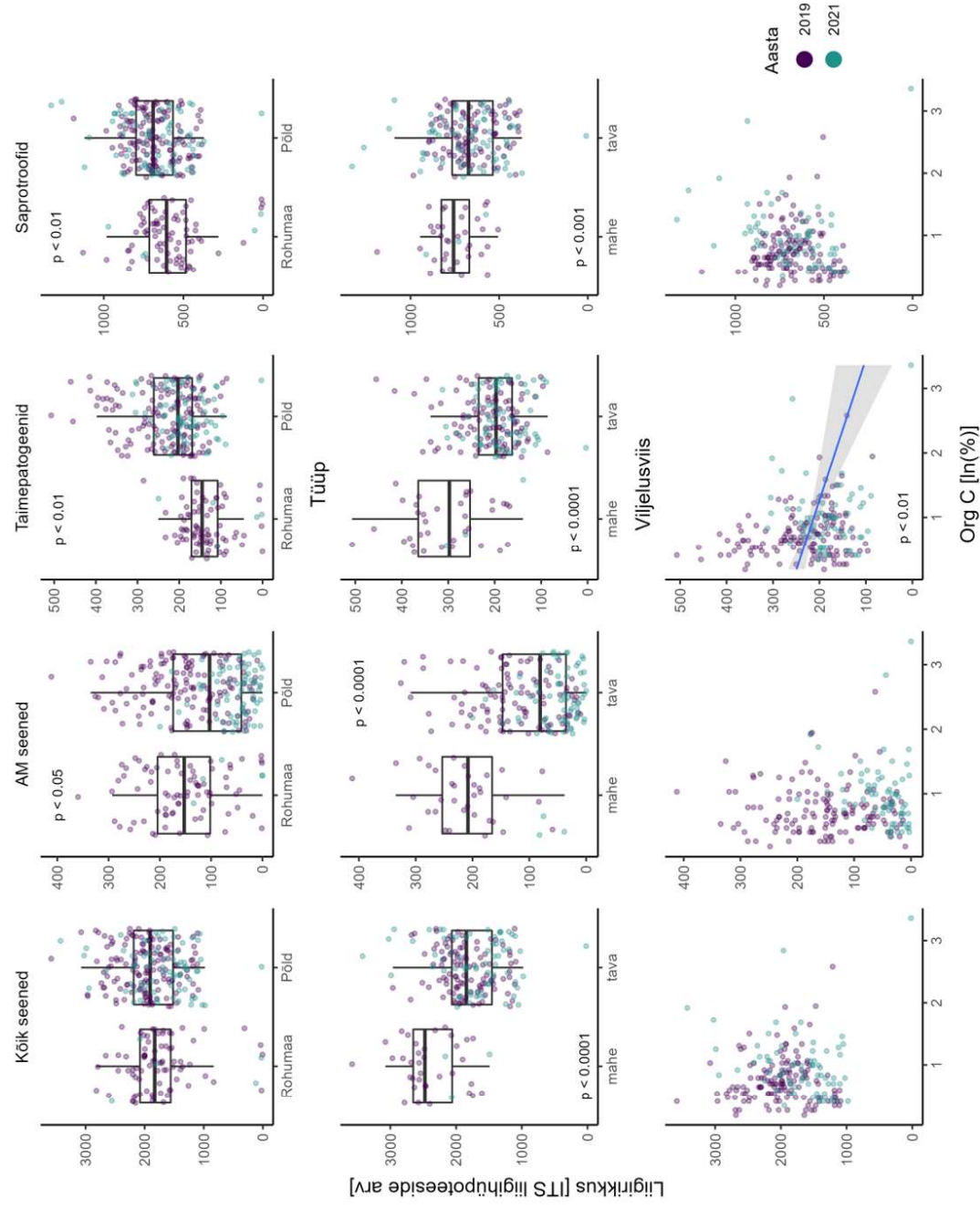
Parameetri statistiline hinnang (<i>Parameter estimate</i>)													
Sõltuv muutuja		Tüüp-Põld	Viljelusviis-Tava	ln(Org C)	Soilchem PC1	Soilchem PC2	Aasta-2021	Tüüp	Viljelusviis	Org C	Soilchem PC1	Soilchem PC2	Aasta
Mudel tüübi mõjuga	Kõik seemned	73,9520	-	-157,9740	-544,7558	-1213,4836	-238,8663	0,3553		0,0028	0,0099	0,0000	0,0008
	AM seemned	-26,4779	-	-23,1030	-203,2584	-247,1789	-86,2094	0,0370		0,0011	0,0000	0,0000	0,0000
	Patogeensed seemned	60,0086	-	-13,6434	59,1137	-26,5190	-35,8740	0,0044		0,0546	0,3656	0,0119	0,0029
	Saprootroofsed seemned	77,3793	-	-5,2882	33,5034	-141,7021	-6,3842	0,0086		0,7826	0,8796	0,0045	0,8050
Mudel viljelusviisi mõjuga	Kõik seemned	-	-476,4412	-94,2697	-678,4211	-1414,2743	-160,7639		0,0000	0,2879	0,3097	0,0108	0,0267
	AM seemned	-	-68,8151	-8,4725	-299,1549	-246,6529	-77,0265		0,0000	0,4793	0,0000	0,0003	0,0000
	Patogeensed seemned	-	-88,8069	-42,3098	-13,5999	-123,6652	-13,3755		0,0000	0,0011	0,4958	0,2650	0,3213
	Saprootroofsed seemned	-	-88,1611	18,1059	192,7158	-423,3157	7,4449		0,0063	0,5789	0,5780	0,0910	0,8128
Mudel tüübi mõjuga	Kogu biomass	-21,5074	-	57,1046	-56,0582	-30,7373	-2,0432	0,0000		0,0000	0,0974	0,0661	0,5690
	Kõik seemned	-0,6508	-	0,1479	-0,6674	-4,1760	0,3103	0,0001		0,1536	0,8626	0,0000	0,0294
	AM seemned	-8,5726	-	0,0517	1,1951	-43,0974	-4,6270	0,0000		0,9338	0,0108	0,0000	0,0000
	Bakterid	-7,3920	-	32,0311	-23,1311	9,1105	1,0164	0,0003		0,0000	0,3080	0,0561	0,5710
Biomass (nmol/g)	ln(Seened:bakterid)	-0,1139	-	-0,4842	-0,1343	-0,6645	-0,1462	0,7531		0,0000	0,2288	0,0210	0,3941
	Kogu biomass	-	-5,5559	42,8468	-27,3832	-35,1337	1,3314		0,0611	0,0000	0,3633	0,1853	0,6480
	Kõik seemned	-	-0,0621	0,3399	-0,2845	-1,0783	0,2757		0,6923	0,0399	0,6796	0,4804	0,1662
	AM seemned	-	-4,0885	3,1525	-11,3720	-21,2385	-4,1553		0,0000	0,0006	0,0933	0,0006	0,0003
Mudel viljelusviisi mõjuga	Bakterid	-	-1,4183	21,2895	-13,4895	-14,2697	3,6791		0,1679	0,0000	0,3195	0,3129	0,0161
	ln(Seened:bakterid)	-	-0,0992	-0,3109	-0,2820	0,2362	-0,3386		0,4776	0,0323	0,6427	0,7758	0,0941

3.1.1 Üldmõõdikud – molekulaaranalüüsid

Seente molekulaarselt määratud elurikkuse mustrid (Joonis 3) näitavad, et mullaseente elurikkuse poolest on uuritud põllud ja püsirohumaad üldise seente liigirikkuse osas sarnased. Krohmseeni ja taimede patogeene leiti külvikorras olevatel põllumaadel oluliselt rohkem kui püsirohumaadel, samas kui saprotroofseid seeneliike esines rohkem külvikorras olevatel põldudel. Sarnaseid tulemusi on saadud ka käesoleva projekti aluseks olevas uuringus (Vahter et al., 2020), mis näitab, et uute proovide lisandumine seniseid järeldusi ei muuda – üle kõigi uuringualade on püsirohumaade ja külvikorras olevate põldude mullaseente liigirikkused üsna sarnased ning erinevused avalduvad troofiliste gruppide tasemel.

Mahe ja tavaviljeluses olevatel põldudel erineb seente liigirikkus statistiliselt oluliselt nii üldseente, AM seente kui ka taimepatogeenide ja saprotroofide seas. Varasem, 2020 aasta uuring leidis, et ka saprotroofsed seened on viljelusviisist mõjutatud.

Mulla orgaanilise süsiniku sisaldus mõjutab statistiliselt oluliselt üldseente ja patogeensete seente liigirikkust. Need tulemused peegeldavad laiemalt ökoloogilist seaduspära, kus ökosüsteemi toitelisuse suurenedes väheneb organismide liigirikkus, kuid suureneb nende biomass (Oksanen, 1996; Bastida et al., 2021). Seda põhjustavad kiirekasvuliste ja tugevate konkurentide eelised tingimustes kus toiteained ei ole seente bioproduktiooni limiteerivad. AM seente grupis suhet mulla orgaanilise süsinikuga ei leitud ning see on tõenäoliselt seletatav AM seente mutualistliku eluviisiga – AM seened ei suuda ise olulisel määral orgaanilist ainet lagundada ning on seetõttu ka mulla süsinikusisaldusele vähetundlikud (van der Heijden et al., 2015).



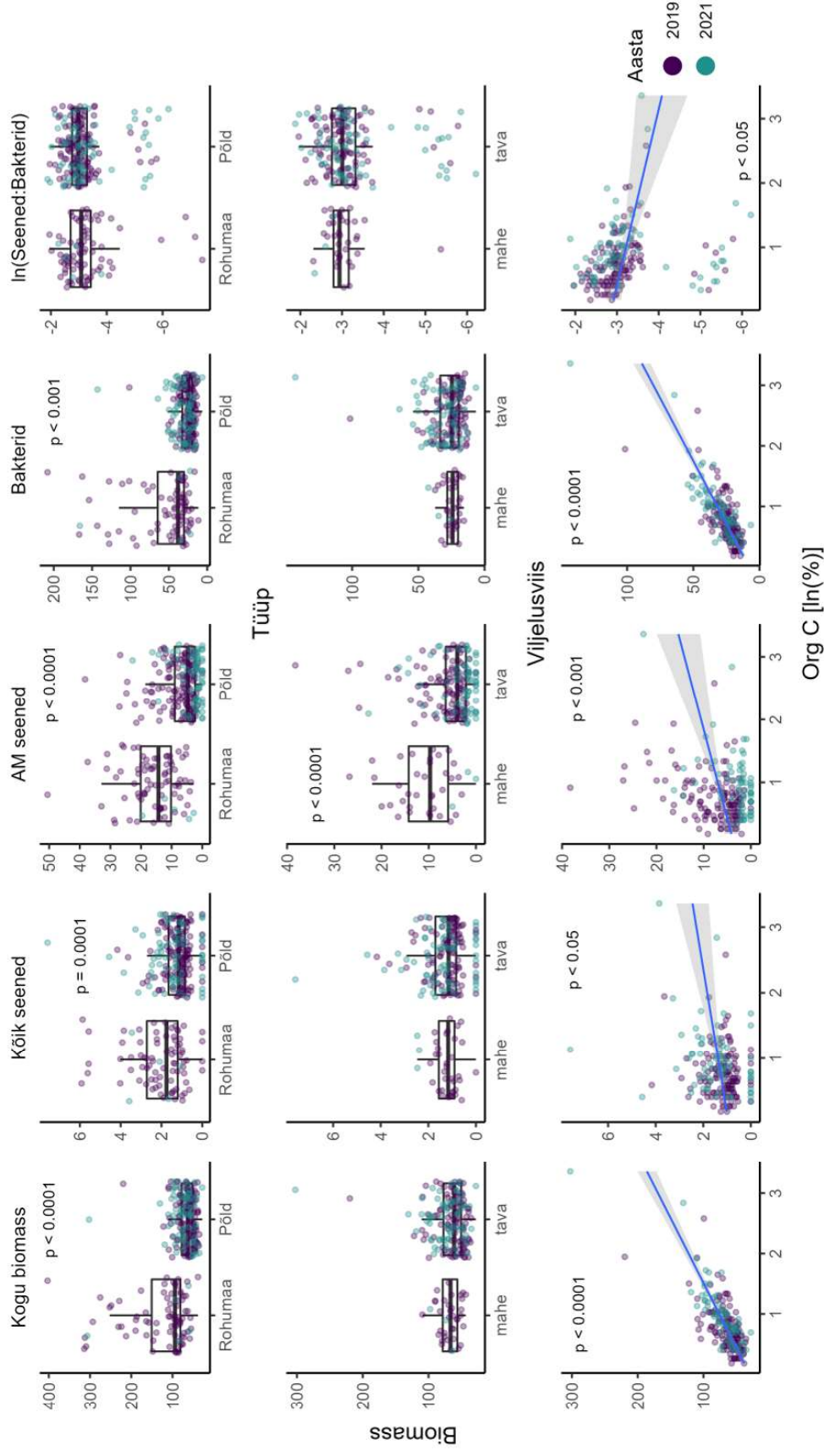
Joonis 3. Mullaseente liigihüpoteeside arv põllumassiivi tüübi (püsirohumaa, põld), viijelusviisi (mahe, tava) ja mulla ln transformeeritud orgaanilise süsiniku sisalduse järgi on esitatud ridadena. Seente funktsionaalsed grupid (kõik seened, AM seened, taimepatogeenid ja saprotroofid) on esitatud tulpadena. Punkti värv tähistab proovivõtu aastat. Gruppidevahelise statistiliselt olulise erinevuse korral on toodud p-väärtus joonisel.

3.1.2 Üldmõõdikud – mulla biomarker-rasvhapped

Mulla biomarker-rasvhapete analüüsi tulemused näitavad, et püsirohumaade ja põldude seas erinevad üksteisest oluliselt kõigi troofiliste gruppide biomassid (Joonis 4). Seente ja bakterite biomasside omavaheline suhe oli seejuures püsirohumaadel ja põldudel sarnane, viidates antud parameetri vähesele informatiivsusele põllumajanduslikus kontekstis. Mahe- ja tavaviljeluse põldude mikroobikoosluste võrdluses erinesid troofiliste gruppide tasemel vaid krohmseente biomassid, mis olid maheviljeluses oluliselt suuremad.

Uuritud organismirühmade osas leiti kõigi puhul positiivne seos biomassi ja mulla orgaanilise süsiniku sisalduse vahel (samas kui liigirikkused orgaanilise aine sisalduse suurenedes pigem vähenesid, vt ptk 3.1.1). Seente ja bakterite omavaheline suhe mulla orgaanilise aine sisalduse suurenedes väheneb – see tähendab, et orgaanilise aine sisalduse tõusuga kaasneb ebaproportsionaalne bakteriaalse päritoluga biomassi tõus. Teadmata, kas kõrgema orgaanilise süsiniku sisaldusega massiivide süsinikuvaru on stabiilne, kasvav või vähenev, ei ole sellele protsessile hinnangut võimalik anda. Varasemad tööd viitavad sarnaste tulemuste juures pigem orgaanilise aine mineraliseerumise ja süsinikuvaru vähenemise protsessile (Rousk et al., 2009; Wu et al., 2021).

Tähelepanuväärne on, et 2021. aasta tulemustes esinesid peaaesjalikult seente ja AM seente markerite osas mitmetes proovides alla määramispiiri tulemused. See tähendab, et kuigi proovide tegelik biomarker-rasvhapete sisaldus ei ole null, on ainus variant neid andmeid statistiliselt töödelda kas nende proovide välja jätmine või võrdsustamine nulliga. Antud juhul sooviti kasutada kõiki andmeid ning seetõttu võivad liigsed nullväärtused (*zero-inflated*) andmestikus ka mõju avaldada. Liigsete nullväärtustega andmestike analüüsimiseks on olemas selleks sobilikud meetodid, kuid nende kasutamine ainult osal analüüsides ohverdaks tulemuste järjepidevuse, näiteks seires (Xu et al., 2015). Samuti ei ole põhjust arvata, et biomarker-rasvhapete sisalduse alla määramispiiri jäämist ning määramispiiri sisse jäävat sisaldust mõjutaksid erinevad protsessid, mis tingiks ilmtingimata *zero-inflated* mudelite kasutamise. Samas ei ole antud tulemuste põhjal põhjust arvata, et analüüsitud muldade orgaanilise aine sisaldus oleks tulemusi oluliselt mõjutanud, näiteks segavate orgaaniliste hapete sisalduse tõttu. Allpool määramispiiri olid pigem madala süsinikusisalduse ja tõenäoliselt madala mikrobiaalse biomassiga mullad.

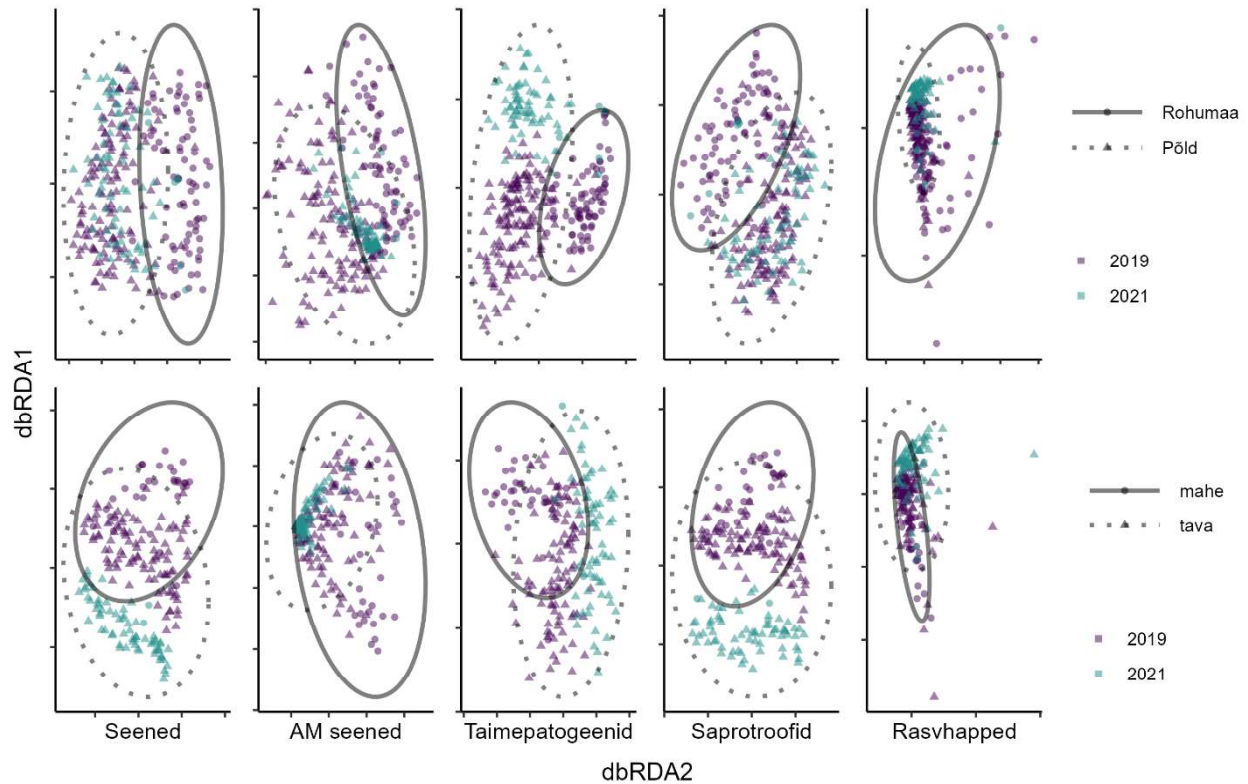


Joonis 4. Mulla mikroobikoosluse biomass põllumassiivi tüübi (püsirohumaa, põld), viljelusviisi (mahe, tava) ja mulla ln transformeeritud orgaanilise süsiniku järgi on esitatud ridadena. Seente funktsionaalsed grupid (kõik seened, AM seened, taimepatogeenid ja saprootroofid) on esitatud tulpadena. Punkti värv tähistab proovivõtu aastat. Gruppidevahelise statistiliselt olulise erinevuse korral on toodud p-väärtus joonisel.

3.2 Tulemused – mulla mikroobikooslused

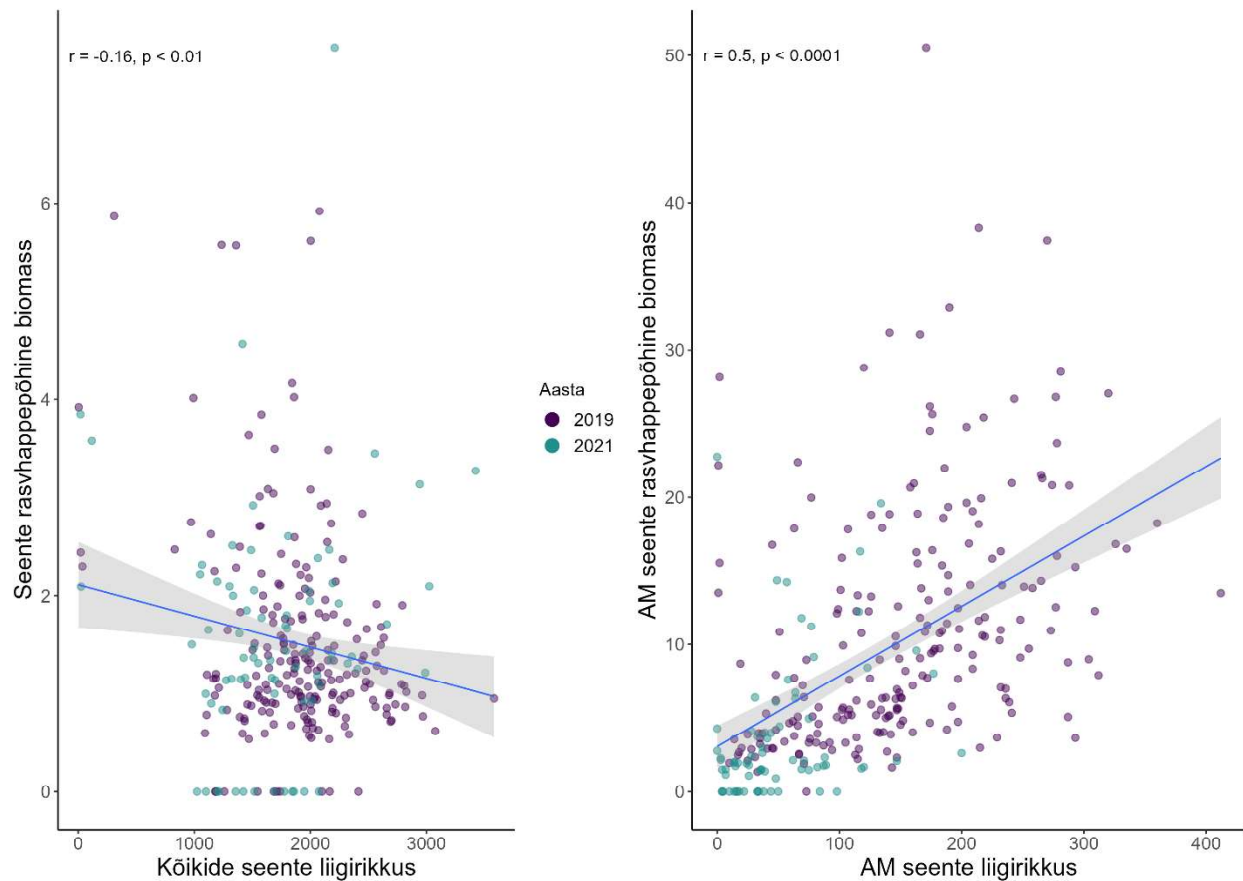
Mulla mikroobikooslused uuritud maakasutustüüpide ja viljelusviiside lõikes on kujutatud Joonisel 5. Kuna kõikidel juhtudel on tegemist põllumajandusmaastikega, on kooslused olenemata maakasutusest ja viljelusviisist üsna sarnased. Sellegi poolest võib molekulaarselt määratud kooslustes näha nihkeid nii püsirohumaade ja põldude kui mahe ja tavaviljeluses olevate massiivide vahel. Nii maakasutuse kui viljelusviiside võrdluses paistavad silma proovivõtu-aastate vahelised erinevused, mis mõjutavad ka uuritavate faktorite mõju hinnanguid – põldude ja püsirohumaade võrdluses eristuvad aastati selgelt taimepatogeenide kooslused; mahe- ja tavaviljeluses eristuvad aastati üldseente, taimepatogeenide ja saprotroofide kooslused. See tähendab, et uuritud maakasutus- ja viljelusviisid mõjutavad seente ja nende troofiliste gruppide kooslusi, kuid seda teevad ka proovivõtu aasta ilmastikuolud.

Mulla biomarker-rasvhapetel põhinev mikroobikoosluse analüüs on pigem vähe informatiivne – nii maakasutus, viljelusviisid kui ka proovivõtuaastad on suhteliselt sarnased. See on tingitud sellest, et erinevalt liigipõhisest andmestikust ei varieeru biomarker-rasvhapete andmestikus määratud ühikute identiteet, vaid ainult nende osakaalud. Kuna seda tüüpi koosluseanalüüsid arvestavad üheaegselt nii kooslust moodustavate ühikute identiteeti kui ka nende proportsiooni, seab see biomarker-rasvhapete ordinatsioonil põhinevale variatsioonile piirid. Seetõttu ei ole koosluste variatsioonil põhinevad rasvhapete biomarkeritega analüüsiväljundid perspektiivseteks indikaatoriteks mulla elustikus aset leidvate muutuste kirjeldamiseks.



Joonis 5. Mulla mikroobikoosluse struktuur kauguspõhise liiasusanalüüsi (distance-based redundancy analysis) põhjal. Ellipsid kujutavad 95% usaldusintervalliga standardhälvet koosluste rühmade tsentroidide ümber. Värvid märgistavad proovide kogumise aastat.

Tähelepanu vääriv on ka seente molekulaarselt määratud liigirikkuste ja biomarker-rasvhapete põhiste biomasside omavahelised suhted (Joonis 6). Kui üldseente biomass ja liigirikkus on ootuspäraselt pigem negatiivses suhtes, siis krohmseente biomass liigirikkuse kasvades samuti tõuseb. Osalt näitab see võrdlemisi suurt erinevust mükoriisat moodustavate krohmseente ja teiste seente ökoloogia vahel, kuid annab samas võimaluse krohmseente puhul teatava enesekindlusega tuletada biomassi trendi liigirikkuse põhjal ja vastupidi.



Joonis 6. Üldseente ja krohmseente liigirikkuse ja biomassi omavahelised suhted uuringualadel.

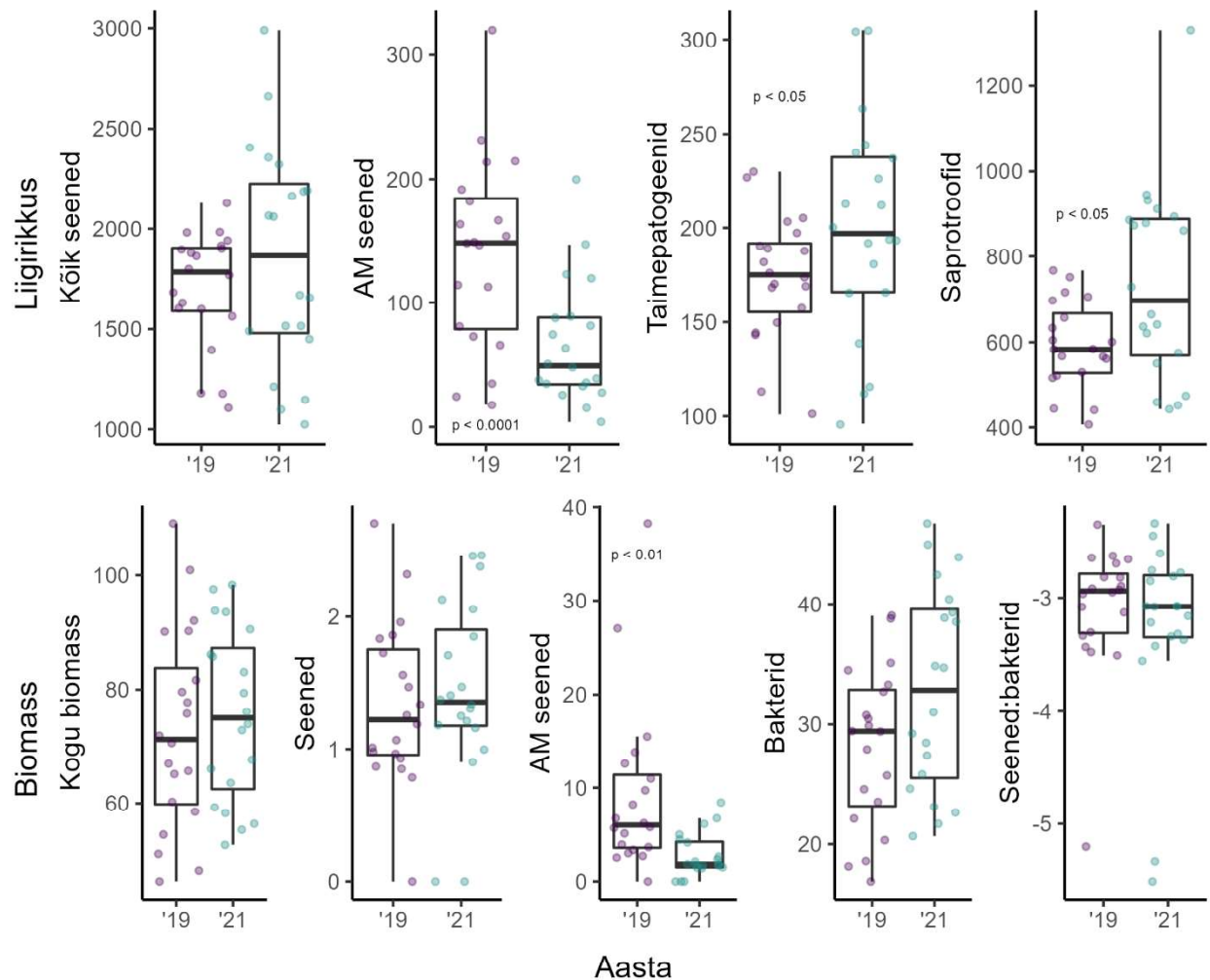
3.3 Tulemused – mullaelustiku parameetrite ajaline dünaamika

Mullaelustiku parameetrite ajalise dünaamika analüüsid põhinevad 24 põllumassiivi proovidel, mis koguti nii 2019. kui 2021. aastal ning on läbinud samasuguse proovide töötamise nii molekulaaranalüüside kui biomarker-rasvhapete analüüside osas. Proovid on kogutud sama meetodika alusel ligikaudu samadest kohtadest massiivil, mistõttu annavad hea ülevaate hinnatud parameetrite variatsioonist lühikese ajaperioodi vältel.

3.3.1 Ajaline dünaamika – üldmõõdikud

Üle kõikide kordusproovide alade (24) määratud parameetrite omavahelises võrdluses selgus, et liigirikkuse poolest olid 2019 ja 2021 üldiselt suhteliselt sarnased, kuid troofiliste gruppide lõikes olid erinevused siiski olulised (Joonis 7). Nii olid krohmseente kooslused 2021. aastal

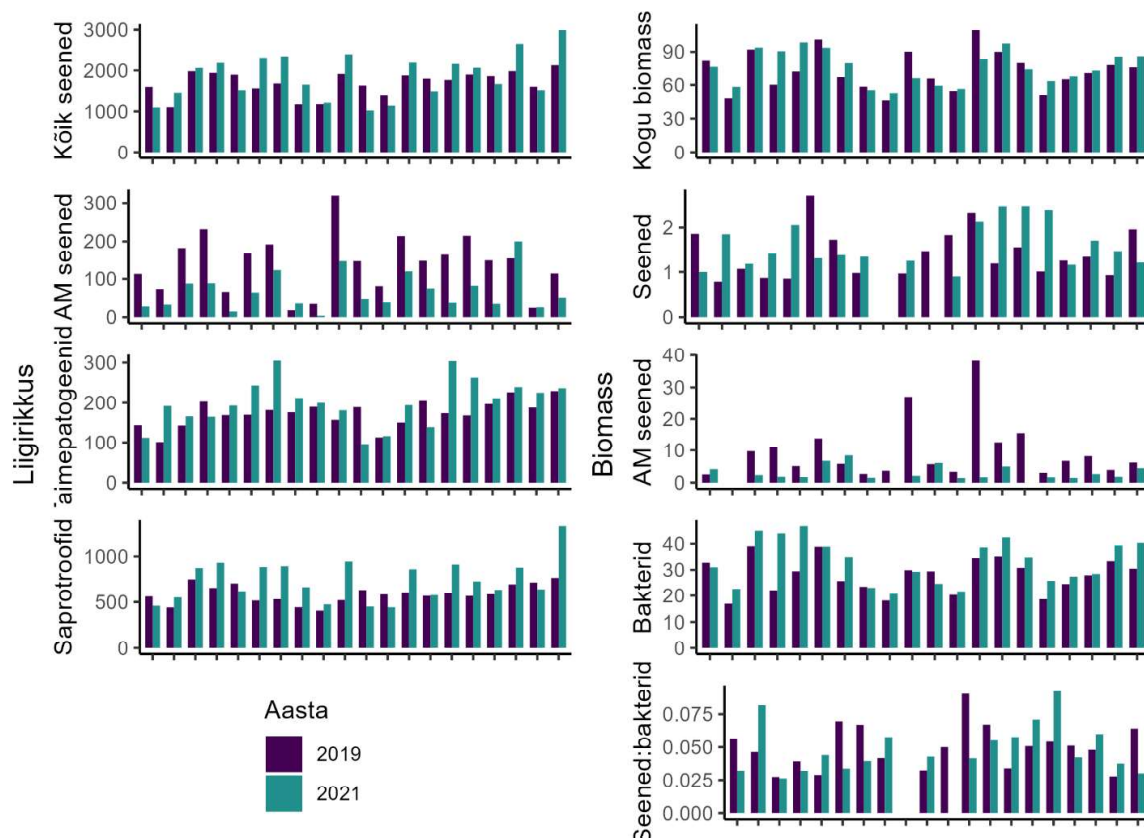
keskmiselt oluliselt liigivaesemad, taimepatogeenide ja saprotroofsete seente kooslused keskmiselt oluliselt liigirikkamad kui 2019. aastal. Keskmiste biomasside võrdluses olid eri aastatel kogutud proovid sarnasemad, kuid krohmseente biomass oli 2021. aastal siiski oluliselt madalam kui 2019. aastal.



Joonis 7. Molekulaarselt määratud keskmiste liigirikkuste ja biomarker-rasvhapetel põhinevate keskmiste biomasside võrdlus olenevalt proovivõtu aastast. Gruppidevahelise statistiliselt olulise erinevuse korral on toodud p-väärtus joonisel.

Individuaalsete proovialade võrdluses (Joonis 8) on eri aastatel saadud tulemused üldjuhul sarnased, kuid suured erinevused leiti eeskätt krohmseente liigirikkuste ning üldseente ja krohmseente biomasside ning viimasest tuleneva seente:bakterite omavahelise seose vahel.

Seega, kuigi kogu liigirikkus ja biomass olid aastate võrdluses suhteliselt sarnased, esines troofilistes gruppides märkimisväärsed erinevusi. Kuigi tulemustes kajastub nii mulla heterogeensuse, proovide kogumise kui ka laboratoorse analüüsi variatsiooni summa, on siiski tõenäoline, et proovivõtu aastal valitsenud ilmastikuolud ja agronoomilised tingimused (sh kasvatatavad kultuurid) on mõjutanud rohkem seente kui teiste organismirühmade biomassi. Kuigi krohmseened on mullas väga olulised, on nad biomassilt mullaelustikus pigem vähearvukad (Balser et al., 2005), mistõttu kajastub nende biomassi vähenemine hõlpsamalt ka sekveneerimisandmetes, sest amplikonipõhises sekveneerimises jäävad tuvastamata pigem vähemarvukad taksonid. Samas on varasemad tööd näidanud, et mullast eraldatavas DNAs on isegi kuni 40 % pärit surnud organismidest (Carini et al., 2016), mistõttu kirjeldab DNA-põhine elurikkus pigem viimaste aastate elurikkust, mitte elurikkust proovi kogumise hetkel.

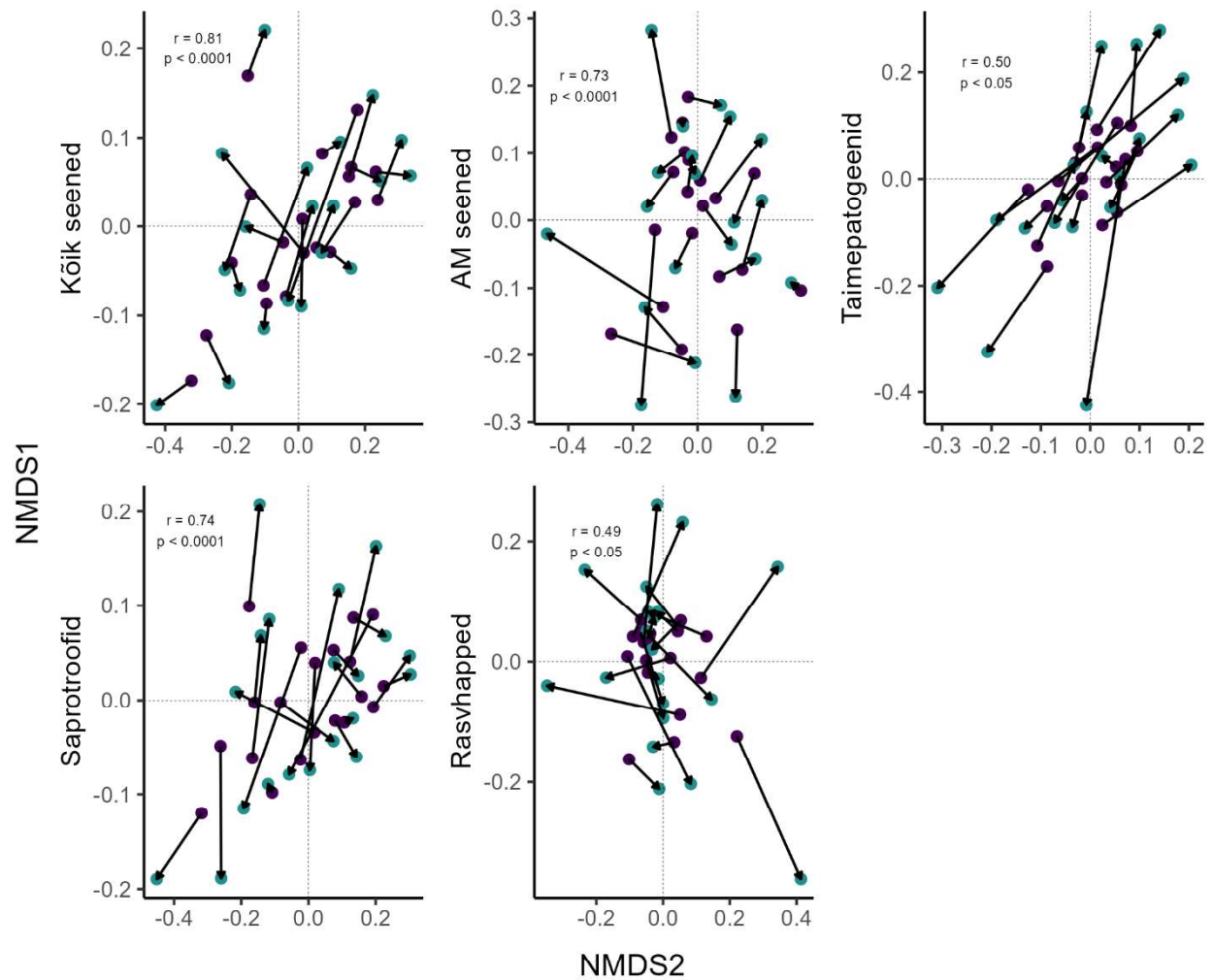


Joonis 8. Liigirikkuste ja biomasside võrdlused kordusproovide aladel (24). Iga tulbapaar tähistab üht proovivõtuala, värvidega on eristatud proovivõtu aastad.

3.3.2 Ajaline dünaamika – mikroobikooslused

Mulla seenekoosluste ja rasvhapetel põhineva mikroobikoosluste ajalise variatsiooni hinnangud olid Procrustes analüüsi tulemusel üsna erinevad ning toovad esile koosluste suuremat variatsiooni taimepatogeenide ja rasvhapetel põhinevas mikroobikoosluses (Joonis 9). Kõrgemad korrelatsioonikordajad leiti üle kõigi seente koosluste, krohmseente ja saprotroofide. Kuigi koosluse variatsioon ise ei ole potentsiaalses seire kontekstis kuigi informatiivne, annab erinevate proovivõtuaastate koosluste korrelatsiooni määr infot süsteemis aset leidnud muutuste määra kohta, mis võivad, aga ei pruugi kajastuda liigirikkuste või biomasside üldmõõdikutes.

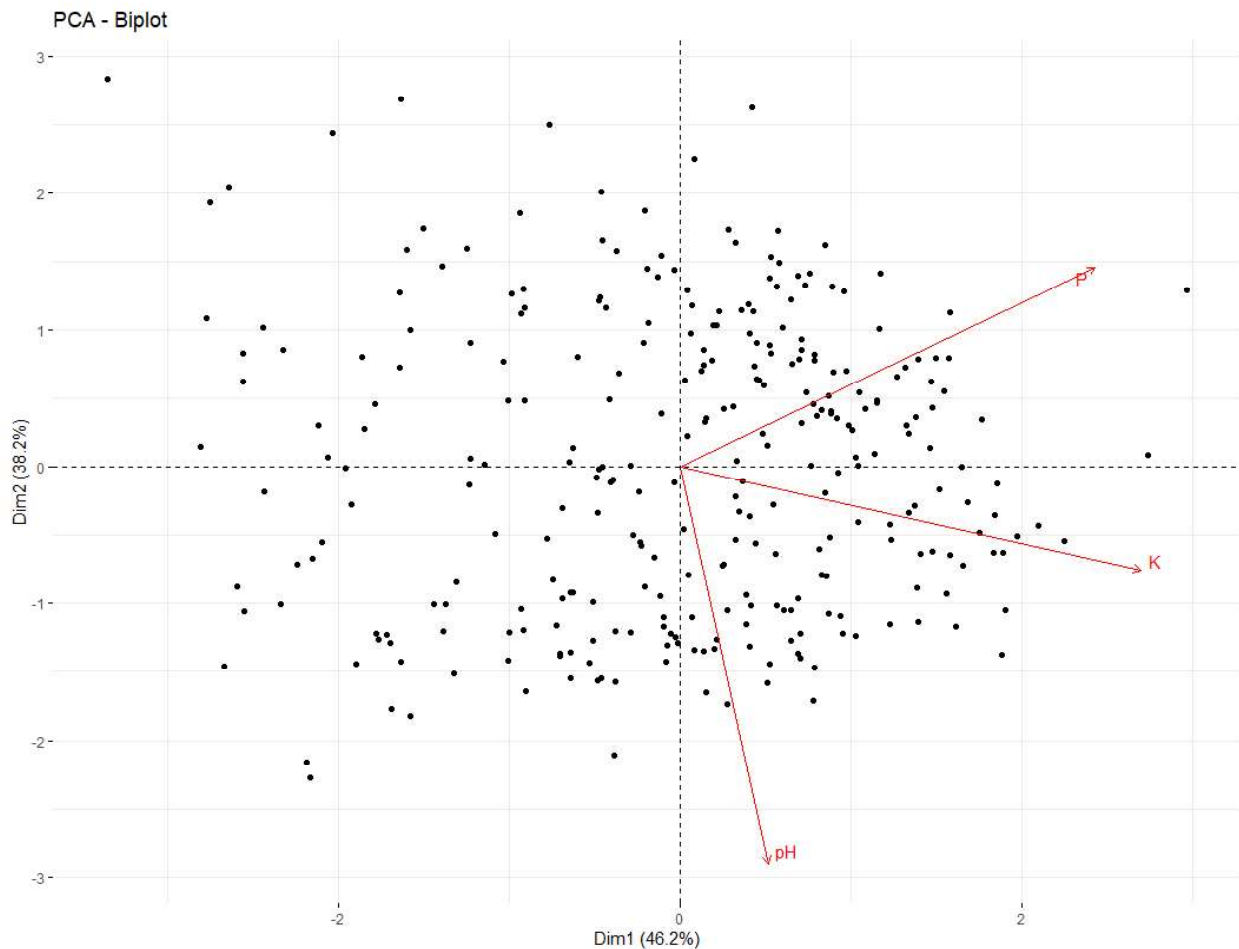
Antud tulemustele tuginedes võib järeldada, et mulla seeneelustiku DNA-põhised kooslused on ajas stabiilsemad kui rasvhapetel põhinevad kooslused. Peetakse tõenäoliseks, et DNA-põhises liikide tuvastamises amplifitseeritakse mullast ka surnud organismide DNA fragmente, mis tõenäoliselt tasandavad liigirikkuse erinevused üksikute aastate vahel (Carini et al., 2016). Surnud organismide DNA eemaldamine PMA (*propidium monoazide*) töötluste abil on võimalik ning näidatud on ka selle mõju mikroorganismide sessoonse mõõtmise tulemustele (Carini et al., 2020). Antud uuringu eesmärkide kontekstis ei saa aga surnud organismide DNA põhjal tuvastamist pidada põhimõtteliseks probleemiks, kuna pigem on seire ja massanalüüside kontekstis probleemiks konkreetse vegetatsiooniperioodi iseärasustest tingitud elurikkuse variatsioon, mis tegelikult huvi ei paku. Küll aga tuleks PMA töötlust kaaluda juhtudel, kus muutused mullaelustikus on eeldatavasti kiired (nt kardinaalne viljelussüsteemi muutus) ning nende muutuste mõju on vaja lühikeses, mõne aastases perspektiivis, hinnata. Eelkõige oleks see aga kohane katselistes süsteemides.



Joonis 9. 2019. ja 2021. aastatel kogutud proovide mullaelustiku koosluste korrelatsioon *Procrustes* analüüsil. Punktid tähistavad proove, joontega on ühendatud eri aastate proovid samas paigas.

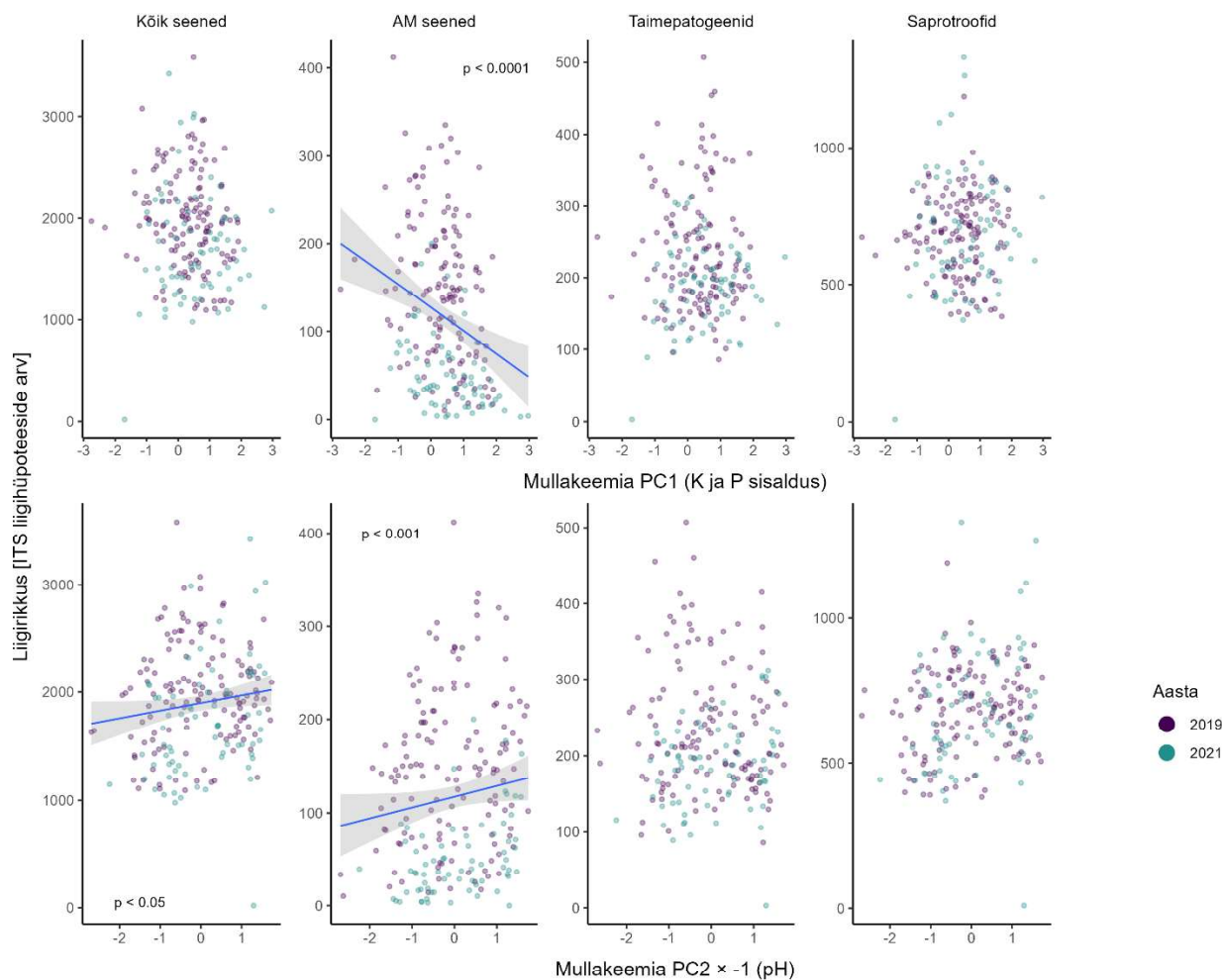
3.4 Seosed mulla agrokeemiliste parameetritega

Mõõdetud mulla keemilised parameetrid seletavad kahe peakomponendina üle 84 % mullakeemia variatsioonist (Joonis 10). Mulla fosfori ja kaaliumisisaldus moodustavad esimese, pH teise peakomponendi. Mulla fosfori ja kaaliumisisaldus on seega omavahel tugevalt seotud, nõrk seos on pH ja kaaliumisisalduse vahel.



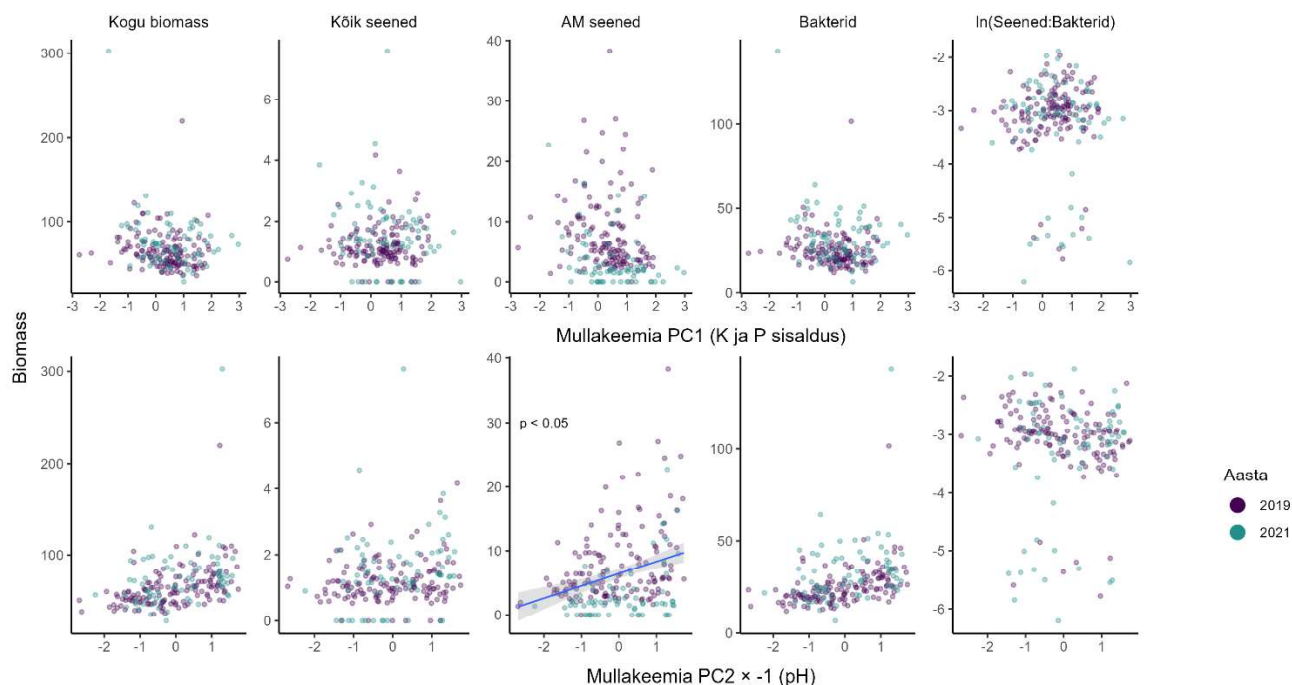
Joonis 10. Määratud mulla keemiliste parameetrite peakomponendid. Mulla pH, fosfori- ja kaaliumisisaldused kirjeldavad kahe peakomponendina 84,4 % mulla keemiliste parameetrite variatsioonist. Teine peakomponent on ringi pööratud ($\times -1$), tehes tulemuste interpreteerimise intuiitsemaks.

Uuritud seenegruppide DNA põhine elurikkus oli segamudelite tulemusel (Joonis 11) seotud krohmseente puhul mullakeemia esimese (K ja P sisaldus) ja teise peakomponendiga (pH). Kõikide seente elurikkus oli segamudeli tulemusena seotud pH-ga.



Joonis 11. Seosed mulla keemiliste parameetrite peakomponentide ja DNA põhise seente elurikkusega funktsionaalsete gruppide kaupa. Punkti värv tähistab proovivõtu aastat. Statistiliselt olulise lineaarse segamudeli seose korral on toodud p-väärtus joonisel.

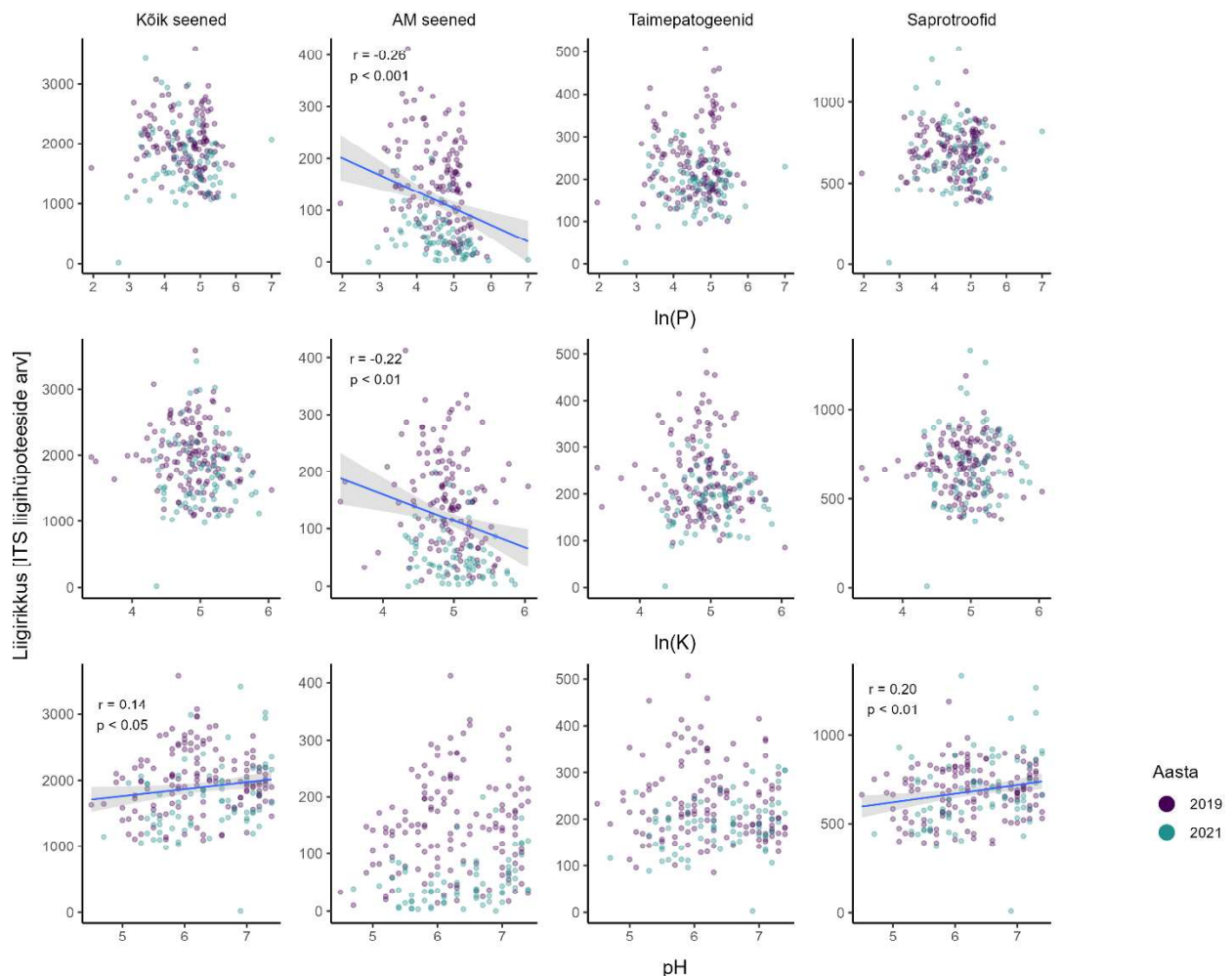
Segamudelite tulemused näitasid, võrrelduna teiste mudeli seletavate faktoritega, vähest lisa-seletusvõimet mullaelustiku rühmade biomasside jaotusele (Joonis 12). Vaid krohmseente biomass oli seotud pH peakomponendiga.



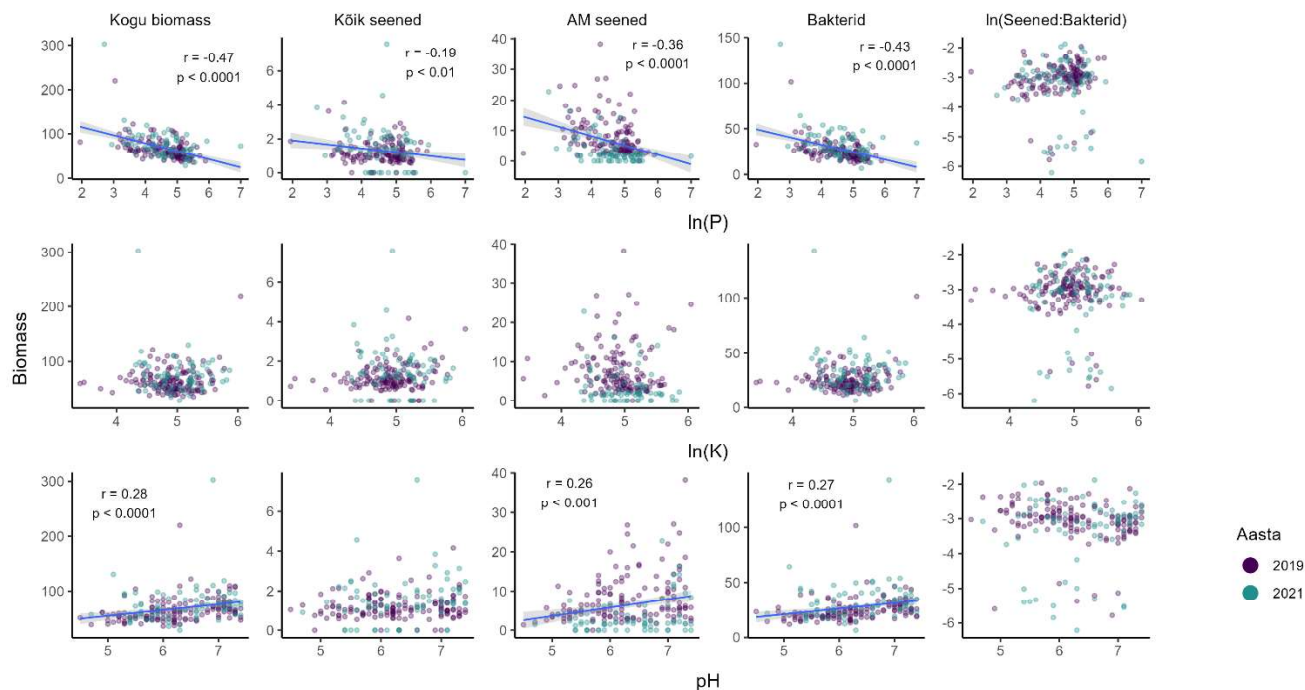
Joonis 12. Seosed mulla keemiliste parameetrite peakomponentide ja mulla biomarker-rasvhapete sisaldustega organismirühmade kaupa. Punkti värv tähistab proovivõtu aastat. Statistiliselt olulise lineaarse segamudeli seose korral on toodud p-väärtus joonisel.

Segamudelid mulla keemiliste parameetrite peakomponentidega näitavad üldjuhul, et mudeli teised komponendid (ruumiline paiknemine, maakasutus, viljelusviis) seletavad juba suurt osa mullaparametrite variatsioonist. Nii on tõenäoline, et näiteks maakasutuse tüüp (põld või rohumaa) ja viljelusviis (mahe või tava) on seotud mh väetusrežiimiga ning need faktorid kirjeldavad juba suures osas ka mulla toiteainete sisalduse variatsiooni. Seejuures on oluline märkida, et mudeli tulemustest ei saa lõplikult selguda põhjuslik seos mullakeemia, maakasutuse, viljelusviisi ja bioloogiliste parameetrite vahel. Kahtlemata mõjutab maakasutus ja viljelusviis ka süstemaatiliselt mullakeemiat, kuid kindlasti sõltuvad mullaparametritest ka põllumajandustootja valikud maakasutuse ja viljelusviisi osas. Seetõttu peaks ka tulemusi tõlgendama segamudeli kontekstis selliselt, et majandamine ja mullakeemia on omavahel seotud ning mõjutavad mullaelustikku kombineeritult. Mullaparametrite ja majandamisviiside mõjude täiendavaks eraldamiseks (kui seda tahta teha) on vaja läbi viia eksperimentaaluurimusi või juhendada mujal läbi viidud eksperimentide tulemustest. Põllumajanduse kontekstis on see aga pigem vähesisukas eelpool mainitud faktorite seotuse tõttu päris tootmises.

Pearsoni korrelatsioonid mõõdetud mulla keemiliste parameetrite ja seente troofiliste gruppide elurikkuse ning organismirühmade biomassidega on esitatud joonistel 13 ja 14. Antud korrelatsioonidesse tuleb ilma mudelarvutusteta suhtuda ettevaatlikult, kuna, nagu eelnevalt kirjeldatud, ei ole need parameetrid sõltumatud üksteisest (P ja K) ega ka majandamisviisidest. Nii võivad näiteks negatiivsed elurikkuse või biomassi korrelatsioonid mulla P ja K sisaldustega viidata hoopis mineraalväetiste mõjule, juhul kui mineraalselt väetatud põldude mullatoiteainete sisaldused olid valimis kõrgemad kui orgaanilisi väetisi saavatel põldudel. Üldise universaalse tendentsina võib välja tuua mullaelustiku elurikkuse ja biomassi kõrgemad väärtused neutraalilähedase mulla reaktsiooniga.



Joonis 13. Pearsoni korrelatsioon mulla keemiliste parameetrite ja DNA põhise seente elurikkusega funktsionaalsete gruppide kaupa. Punkti värv tähistab proovivõtu aastat. Statistiliselt olulise korrelatsiooni korral on toodud p-väärtus ja korrelatsioonikordaja joonisel.



Joonis 14. Pearsoni korrelatsioon mulla keemiliste parameetrite ja mulla biomarker-rasvhapete sisaldustega organismirühmade kaupa. Punkti värv tähistab proovivõtu aastat. Statistiliselt olulise korrelatsiooni korral on toodud p -väärtus ja korrelatsioonikordaja joonisel.

3.5 Tulemuste kokkuvõte

Projekti käigus analüüsitud mullaproovide tulemused näitavad, et nii molekulaarsel seeneliikide tuvastamisel kui ka biomarker-rasvhapetel põhinevatel biomassi hinnangutel on informatiivsuses oma tugevused ja nõrkused (kokkuvõtlikult esitatud Tabelis 4). Mõlemad meetodiga saadud andmed kirjeldavad mullaelustikus aset leidvaid põhilisi trende ning annavad spetsiifilisemat infot troofiliste tasemete või organismirühmade lõikes. Enamike hinnatud mõõdikute puhul olid meetodid komplementaarsed, üksteist täiendavad. Vaid koosluse tasemel muutused seeneelustikus või mulla mikroobikoosluse struktuuris olid kasutatud faktorite (maakasutus, viljelusviis) osas vähe-informatiivsed. See aga ei välista kooslustel põhinevate mõõdikute kasutamist seires pikaajaliste trendide jälgimiseks uuringuala põhiselt.

Tabel 4. Meetodikate informatiivsus uuringus kasutatud seletavate faktorite lõikes. Ajalise variatsiooni hinnangutes väljendatakse erinevate toonidega meetodikate lühiajalise variatsiooni määra, kus roheline on pigem väheste variatsiooniga ning punane kõrge variatsiooniga mõõdik, andmata hinnangut selle informatiivsusele.

Faktor	DNA põhine liigirikkus				Biomarker-rasvhapete põhine biomass				
	Üld-seened	AM seened	Patog. Seened	Sapr. Seened	Üld-Biomass	Seened	AM seened	Bakterid	Seen:bak
Maakasutus									
Viljelusviis									
Maakasutus koosluses					Ei erista koosluses organismirühmi				
Ajaline variatsioon									
Ajaline variatsioon kooslustes					Ei erista koosluses organismirühmi				

Informatiivne
Mööndustega informatiivne
Ei ole informatiivne

Mullas leiduval DNA-l põhinevad seeneelustiku liigirikkuse analüüsid olid üldjuhul informatiivsed nii põldude ja püsirohumaade kui ka mahe- ja tavaviljeluse eristamisel, sh troofiliste tasemete lõikes. Kuna troofilised grupid, mükoriisat moodustavad krohmseened, taimede patogeenid ja lagundajad, kannavad endas spetsiifilist infot oluliste protsesside kohta mullas (nt toiteainete transport, haiguspuhangu tõenäosus, lagundamise efektiivsus), siis on nende määramine otstarbekas mitte ainult mulla üldise bioloogilise seisundi hindamiseks, aga ka potentsiaalselt majandamisotsuste tegemiseks. Seejuures oli DNA-põhiste mõõdikute ajaline variatsioon kahe proovivõtu aasta vahel kas väike (üldseened) või suur (troofilised tasemed), mis näitab, et seente üldine liigirikkus on lühikeses perspektiivis suhteliselt stabiilne, kuid troofiliste tasemete liigirikkustes on variatsioon pigem suur. Seire kontekstis annab see komplementaarset infot nii mullaelustiku üldseisundi kui ka konkreetsest aastast tingitud iseärasustest. Kuna korrelatsioon DNA-põhistes liikide kooslustes oli pigem kõrge, võib arvata, et suurem

variatsioon liikide arvus leiab aset vähearvukate liikide arvelt. Samas on ka uuringuid, mis näitavad, et kuigi vana DNA osakaal proovis tasandab ajalisi nihkeid liigirikkuses ja liikide koosseisus, on ajaline variatsioon mulla mikroobikoosluses siiski väiksem kui ruumiline, proovide kogumisest tingitud variatsioon (Carini et al., 2020). Edasised uuringud peaksid Eesti kontekstis välja selgitama ruumilise ja aastasisese hooajalise variatsiooni määrad mullaelustiku mitmekesisuses ja struktuuris.

Mulla biomarker-rasvhapete analüüsi tulemused näitavad võimet eristada süsteemseid maakasutusest tingitud muutuseid organismirühmade biomassides, kuid on vähem informatiivsed väikeste mikroobikoosluse muutuste osas. Sellele vaatamata on näiteks krohmseente spetsiifiline rasvhappemarker tundlik ka viljelussüsteemide osas. Kuna krohmseened on taimede juurte sümbiontidena olulised nii toiteainete omastamisel kui ka kaitsel biootilise ja abiootilise stressi eest, on nende ohtruse hinnang vaatamata teiste markerite vähesele seletusvõimele siiski oluline. Sarnaselt mulla DNA-l põhinevatele elurikkuse mõõdikutele, ei tähenda vähene variatsioon viljelusviisides siiski seda, et metoodika ei võiks olla informatiivne alapõhiste trendide jälgimiseks, näiteks seire kontekstis. Tulemustele tuginedes võib öelda, et mulla biomarker-rasvhapete analüüsi tulemused on üldjuhul vähem muutuvad, kuid indikeerivad siiski suuremaid muutusi mulla mikroobikooslustes. Edasised uuringud peaksid sarnaselt DNA-l põhinevatele mõõdikutele, olema keskendunud ajalise- ja ruumilise variatsiooni määra kindlaks tegemisele.

3.6 Tulemuste massiivipõhise esituse lahendus

Tulemuste esitamise lahenduse lähtekohaks võeti potentsiaalne vajadus nn massanalüüsi käigus toodetavaid keerukaid andmeid edastada põllumajandustootjale personaliseeritud ent ülevaatlikus vormis. Massiivipõhise tulemuste esitamise aluseks on kogu alusandmestiku (293 proovi) seente elurikkuse ja biomarker-rasvhapete näitajad, sh troofiliste rühmade ja organismirühmade kaupa. Massiivipõhise tulemuse esitamiseks tekitatakse keskkonnas R (kasutades R Markdown formaati) iteratiivselt iga proovide andmetabeli rea kohta *.html* formaadis ülevaatlik raport (Joonis 15) fookuses oleva proovi DNA-põhise elurikkuse ja rasvhapetepõhise biomassi võrdlusest teiste Eesti, piirkonna (antud näite puhul kasutatud piirkonnana 20 geograafiliselt lähimat proovi), sama viljelusviisi ning alternatiivse viljelusviisiga sama tüüpi proovidest (põld või püsirohuma). Joonistel näidatakse, millisesse protsentiili rühma üldhulgas kuulub fookuses oleva proovi elurikkus või rasvhappepõhine biomass.

Antud lahendus on üks paljudest võimalikest, kuid on sobilikuks lähtekohaks edasele arendusele. Kuna mullaelustiku liigirikkus ja elustikurühmade biomass on sõltuv nii mulla, kliima, ilmastiku kui ka majandamise kontekstist, ei ole võimalik kõikidele massiividele seada samasid eesmärke või referentsväärtuseid. Seetõttu on välja toodud lahendus võrdlustekeskne, asetades konkreetse põllumassiivi tulemused teiste massiivide ja majandamisviiside konteksti.

Esitatud lahenduses on referentsiks kõik vastavasse majandamiskategooriasse kuuluvad massiivid, sõltumata proovide kogumise aastast. Perspektiivis tuleks juhuanalüüsidel põhinevate raportite koostamisel kasutada ajakohast referentsandmestikku või referents-alade võrgustikku alusandmete proovivõtu aastast tingitud erisuste vähendamiseks. Ajakohase (st juhuanalüüsiga sama aasta andmed) referentsandmestiku kasutamine muutuks realistlikuks pigem suure iga-aastase proovide arvu puhul, kuid kuna referentsiks kasutatavad proovialad ei oleks iga aasta samad, muudaks see põllumajandustootjale tulemuste võrdluse aastate vahel keerukaks. Pikaajaliselt püsivam lahendus oleks referentsalade võrgustiku loomine ning selle kasutamine andmebaasi üldnäitajate iga-aastaseks normaliseerimiseks.

Mulla elustiku raport: proov 2112780

DNA-põhine elurikkus

Kõik seemned: 979 taksonit



Taimepatogeensed seemned: 123 taksonit



AM seemned: 3 taksonit

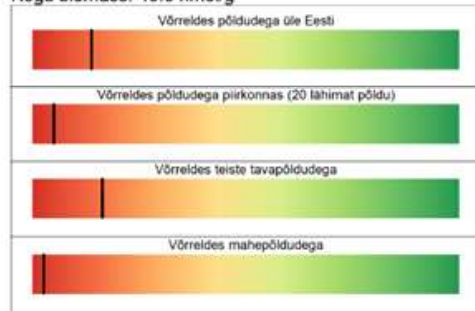


Saprootroofsed seemned: 371 taksonit

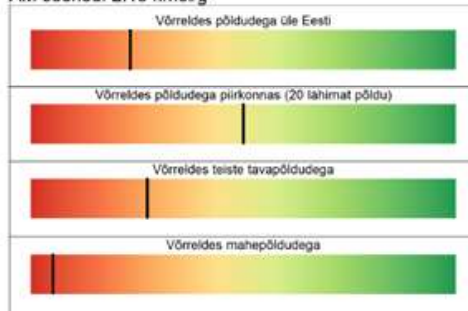


Rasvhapetepõhine biomass

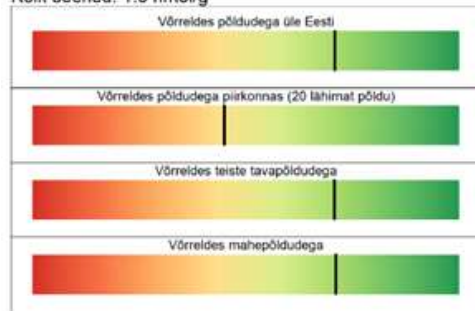
Kogu biomass: 46.6 nmol/g



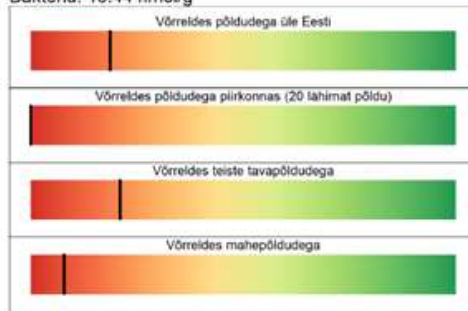
AM seemned: 2.18 nmol/g



Kõik seemned: 1.5 nmol/g



Bakterid: 18.44 nmol/g



Joonis 15. Massiivipõhise esituse lahenduse näidis proovi 2112780T põhjal. Näites esitatud massiiv on tavaviiljeluses olev talinisu põld.

3.6.1 Koodi kasutamine

Koodi tuleb käivitada R keskkonnas (minimaalselt versioon 4.2), kus töökaustas (*working directory*) peavad olema nii R-i failid *Raport.rmd*, *raport_render.R*, kui ka andmetabelid *meta.csv*, *fa_grouped.tsv*, *fa.tsv* (ning liigirikkuse kooslusemaatriksite põhjal uuesti arvutamise korral ka *its_*.tsv* failid). R-i koodid on lihttekstina esitatud Lisa 4. Raportite loomise alustamiseks tuleb jookсутada faili *raport_render.R*. Koodi käitamise tulemusel luuakse töökausta alamkaust *raport_iter*, mis sisaldab kõikide proovialade raporteid *.html* formaadis vormina *raport_proovikood.html*. Üksiku prooviala raporti koostamiseks tuleb sisestada koodi *raport_render.R* prooviID reale huvipakkuva ala proovikood jutumärkide vahele (prooviID <- "2112780"). Üksiku prooviala raporti koostamiseks tuleb jookсутada *raport_render.R* koodi esimest lõiku. Soovi korral saab raportid ümber salvestada *.pdf* formaati.

4 METOODIKATE RAKENDATAVUSE HINNANG

Uuringu üheks lähteülesandeks on anda hinnang rakendatud meetodite sobivusele seiretegevuseks, sh rakendamisel ka rutiinseks mullaelustiku seisundi hindamiseks. Seetõttu keskenduvad järgnevad peatükid uuringus kasutatud metoodikate hindamisele nii nende informatiivsuse, praktilisuse (hind, infrastruktuur, läbilaskevõime, keerukus), kui ka tulemuste tõlgendamise seisukohast. Tähelepanu pööratakse ka metoodikate aegpüsivusele – teaduse järjepidev areng ning täiustumine viib paratamatult mõnede meetodite kõrvale jäämiseni ning see võib olla problemaatiline pikaajalise seiretegevuse koordineerimisel. Seetõttu peab mulla bioloogilise seisundi indikaator olema ühtaegu informatiivne, kandes endas olulist informatsiooni, aga ka piisavalt paindlik, võimaldades selle täiustamist ilma aegriidade katkestamiseta. Järgnevad peatükid põhinevad töövõtja kogemustel (sh antud projektiga) ning ekspertarvamusel kujundatud soovitudel.

4.1 Rakendatavus – molekulaarne mullaorganismide tuvastamine

Kuigi pärilikkusainel põhinevaid uuringuid on läbi viidud ligi 70 aastat, alustades Watson ja Crick (1953) uuringutega DNA struktuurist, on organismide kooslusi kirjeldavad keskkonna DNA (eDNA) ribakoodistamisel põhinevad analüüsid võrdlemisi uued. Niinimetatud järgmise põlvkonna kõrge läbilaskvusega sekveneerimise (*high throughput sequencing*) metoodikad, mis võimaldavad tuvastada mikroobikooslustes individuaalseid liike, on ökoloogilistes uuringutes rakendatavad olnud vaid viimased viisteist aastat. Selle viieteistkümne aasta jooksul on sekveneerimistehnoloogiate ja metoodikate areng olnud väga kiire. Võrreldes esimeste eDNA uuringutega, kus referentsandmebaase veel kasutamiseks ei olnud, saadud sekventsides arv oli tagasihoidlik ning analüüs ise kättesaamatult kulukas, on molekulaarökoloogia valdkond tänaseks läbi teinud plahvatusliku arengu – enamike organismirühmade jaoks on olemas kureeritud ja pidevalt täienevad referentsandmebaasid, sekveneerimise platvormid on muutunud üha paremaks ning analüüsides maksumus on kukkunud drastiliselt. Kui 20 aastat tagasi tuli ühe DNA aluspaari eest maksta umbes 20 eurot, siis täna saab sama summa eest umbes 150 000 aluspaari, olenevalt sekveneerimisplatvormist (Mardis, 2017). Need tegurid on teinud keskkonast

pärineva pärilikkusaine põhjal organismide tuvastamise tänapäevase tippökoloogia lahutamatuks osaks, pannes viimaks aluse ka selle kasutamisele seires.

Informatiivsus

Käesoleva projekti käigus läbi viidud analüüside tulemused näitavad, et molekulaarselt tuvastatud seened on informatiivsed erinevate maakasutustüüpide, püsirohumaade ja põldude, aga ka majandamispraktikate, mahe- ja tavaviljeluse eristamiseks. Tuvastatud liigirikkus on ajas suhteliselt stabiilne, samas kui muutused kooslustes ja troofilistes gruppides võivad olenevalt proovivõtu aasta keskkonnatingimustest olla siiski märkimisväärsed. See tähendab, et tuvastatud liigid olid enamasti proovis olemas nii 2019. kui 2021. aastal, kuid nende proportsionaalne esindatus varieerus suurel määral. Seetõttu oleks mittekorduvates analüüsides (nt ühekordsel analüüsil põllumajandustootjale) otstarbekas väljundmõõdikutena kasutada diversiteedi hinnanguid, mis ei sõltu liikide proportsioonidest, näiteks liigirikkus. Seires, kus aastevaheline variatsioon kannab endas olulist infot, oleks siiski otstarbekas hinnata ka koosluse struktuuri arvestavaid diversiteedi parameetreid, alapõhiselt näiteks Shannoni või Simpsoni diversiteedi indekseid, aga ka alapõhist beeta- ja seirealade ülest gammadiversiteeti.

Kuna molekulaarselt tuvastatud organismide puhul opereeritakse käesolevas uuringus metodoloogiliselt liigi tasemel, avaneb võimalus kasutada infoallikana neile liikidele spetsiifilisi omadusi. Nii on paljude seente kohta teada millise eluviisi (patotroof, sümbiotroof, saprotroof) esindajad nad on või millistes elupaikades neid looduslikult leida võib (Põlme et al., 2020). Pikaajaliste aegridadena võivad liigilised koosseisud seega kanda endas olulist informatsiooni ka mullaökosüsteemi funktsioneerimise kohta (Fischer et al., 2010). Samas sõltub liigi taseme saavutamine ja selle otstarbekus uuringu eesmärkidest – seente elurikkuse asemel on näiteks võimalik hinnata ka kogu eukarüootset või prokarüootset mulla elurikkust (sekveneerides vastavalt sobilikku regiooni), mis on haaratud elurikkuse lõikes kindlasti täielikum, kuid enamasti ei ole saadud andmestik liigi tasemel ning ei võimalda siduda elurikkust liikide omadustega (Sepp et al., 2021). Teisalt on referentsandmebaasid pidevas arengus ning aastate möödudes saavad järjest enam sekventse ka üldiste praimeritega liigi määrangud. Teadusuuringute tulemusena on võimalik kinnitatada funktsioonide konserveerumine ka fülogeneetiliselt kõrgematel tasemetel (nt sugukonna tasemel), kuid pigem on see veel teadusliku debati tasemel ning rakenduslikuks kasutamiseks liialt vähekonsensuslik (Martiny, 2015).

Kuigi molekulaarsetele elurikkuse uurimise meetoditele on omane kiire areng ja vähene püsivus ajas, on neil ka ühine tugevus – korra mullast eraldatud geneetiline materjal säilib sobilike hoiustamistingimuste (nn *Lo-bind* tuubid, -80°C) juures aastakümneid (Rissanen et al., 2010). Seetõttu on tehnoloogiate arenedes või vajaduste muutudes võimalik minna ajas tagasi ning varem kogutud proove uuesti teiste tehnoloogiatega analüüsida. Seega tuleks pikaajalise seire eesmärkide täitmisel näha ette ka mulla geneetilise materjali pikaajalise säilitamise vajadused. Tartu Ülikooli botaanika osakonnas kasutusel olevad -80°C sügavkülmikud mahutavad igaüks umbes 70 000 individuaalset proovituubi, mistõttu on tegelik ruumivajadus seirevajadusi silmas pidades küllalt väike. Samas peavad külmikud olema kaitstud pikemate ($>24\text{h}$, olenevalt külmiku täituvusest) elektrikatkestuste eest. Samaväärseid tulemusi on mullaproovide pikaajalisel säilitamisel oluliselt keerulisem saada, kuna DNA säilimine mullas on kehvem (Guerrieri et al., 2021). Samuti võtavad mullaproovid oluliselt rohkem ruumi.

Aegpüsivus

Sekveneerimistehnoloogiate areng on olnud väga kiire ning see on viinud neid kasutavad teadusharud järjest uute avastusteni. Samas on see toonud kaasa ka hulga ootamatuid probleeme. Kuna sekveneerimise teenuse järele on vajadus suur globaalselt, töötavad sekveneerimisplatvorme arendavad ettevõtted kõrge konkurentsi tingimustes ning täiustavad oma tooteid pidevalt. See on tehnoloogia kasutajatele kaasa toonud ka pideva vajaduse muutuvate tehnoloogia iseärasustega kaasas käia, täiendada oma teadmisi ja ka tööprotsesse. Nii on ka projekti täitjatel tulnud aastate jooksul toime tulla küllalt järskude muutustega sekveneerimistehnoloogiates, iseäranis kui Roche' 454 sekveneerimisplatvorm viidi kasutusest välja ning asendus Illumina sekveneerimisega. Olgugi, et 454 sekveneerimine oli mullas elavate organismide määramiseks mõnevõrra sobilikum (peamiselt lugemite pikkuse tõttu, Vasar et al., 2017), kui teda asendav Illumina, ei ole ökoloogiateadus sekveneerimisteenuste peamine sihtgrupp ning muutustega tuleb paraku lihtsalt kaasas käia. Seetõttu tuli sekveneerimisplatvormi muutudes Tartu Ülikoolis läbi viia ka hulgaliselt referents-uuringuid ning luua uued sobilikud praimerid muutunud lugemipikkusega toime tulekuks. Kui baasteaduses on see võimalik, siis seiretegevuses ei pruugi üleminekuperioodidel olla võimalik läbi viia arendustegevusi, põhjustades seirelünki või seire katkemist. Lisaks toob sekveneerimisplatvormide muutumine, aga ka uuenenud praimerite (nt spetsiifilisemalt seonduvad, väiksemate vigade arvuga jmt)

kasutuselevõtt endaga kaasa uute ja vanade andmete metodoloogilised (süsteemsed) erinevused. See on seire läbiviimisel kindlasti probleemne ning võib viia valede järeldusteni seiratava süsteemi seisundi osas.

Infrastruktuur

Erilist tähelepanu mullaelustiku molekulaarse seiramise juures tuleks pöörata ka referents- andmebaasidele. Tänapäevaks on olemas kureeritud andmebaasid enamike organismirühmade molekulaarseks tuvastamiseks. Need andmebaasid on aga pidevalt täienevad ja täiustuvad ning mõnevõrra käivad kaasas ka sekveneerimistehnoloogiate arenguga. See tähendab, et kuigi näiteks tegelik liikide arv uuringualal ei ole muutunud, võib teisel ajahetkel läbi viidud referents- andmebaasi kasutamine anda mõnevõrra muutunud liikide arvu (aga ka liigimäärangud), kuna andmebaasi on vahepeal täiendatud liikidega, mida seal varem ei olnud (st nad jäid varem tuvastamata). Nii on ka näiteks antud uuringus tehtud 2019. aastal kogutud proovide sekveneerimistulemustele uus bioinformaatiline andmetöötlus koos 2021. aasta proovidega, tagamaks nende omavahelise võrreldavuse ja referents- andmebaasist lähtuva süsteemse vea minimeerimise. Kuna tegu on suurte andmemahtudega, võib see olenevalt seire kestvusest ja proovi(ala)de arvust tähendada tulevikus vajadust kasutada bioinformaatilisteks protseduurideks täiendavat arvutusvõimsust, näiteks arvutusklastrite näol. Samuti tuleks silmas pidada suurte andmehulkade (nt 300 proovi ITS-põhise andmestiku suurus on ligi 20 GB) pikaajalise ohutu säilitamise ja selleks sobilike tingimuste ning lahenduste loomise vajadust.

Füüsilise infrastruktuuri vajaduste hindamisel tuleks eristada mullast DNA eraldamise ja sekveneerimiseks ettevalmistamise (PCR) ning proovide säilitamise etapid ning sekveneerimine sekvenaatoril. DNA eraldamine ei ole labori-infrastruktuuri osas eriliselt nõudlik – täita tuleb puhtuse nõudeid (üldjuhul eriotstarbeliste ruumidena) ja tagada minimaalselt vajaliku aparatuuri olemasolu (analüütiline kaal, vorteksid, inkubaator-loksuti, tsentrifuugid (50ml, 2ml, 0.5ml), DNA kontsentratsiooni mõõtja, termotsükler, külmikud (+4, -20, -80) ning vajalikud pipetid, muu abimaterjal). Infrastruktuuri kõige olulisemaks osaks on sekvenaator, mis sõltuvalt sekveneerimisplatvormist võib oma soetamis- ja püsikuludelt varieeruda mitmetes kordades. Arvestades, et sekveneerimisplatvormid on ajas dünaamilised ning pidades silmas sekvenaatorite hinda (Illumina MiSeq sekvenaator suurusjärgus 100 000 – 200 000 eurot, HiSeq ~600 000 eurot, olenevalt konfiguratsioonist), ligikaudset ühe proovi sekveneerimishinda teenusepakkujate

juures (~6.3 eurot, 350 proovi 2x300bp kiibil), sekvenaatori maksumust ja tehnoloogia uuendamise tempot (hinnates optimistlikult ühe sekveneermistehnoloogia elueaks 10 aastat), tuleks kuluneutraalsuse saavutamiseks analüüsida igal aastal vähemalt 1600 proovi (MiSeq sekvenaatoril odavaimas konfiguratsioonis), arvestamata kiipide ja sekveneermiskeemia jaehinda ning seadme püsikulusid. Seetõttu peab uuringu koostaja sekvenaatori omamist seiretegevuse ja väikesemahulise teenuse pakkumise perspektiivis ebaotstarbekaks ning soovitab sekveneermisteenust osta sisse teenusepakkujalt. Seadmete soetamine muutuks otstarbekaks mass-analüüside läbiviimisel, tõenäoliselt alates suurusjärgust 3000 molekulaaranalüüsi (või 10 sekveneermisjooksu) aastas.

Inimressurss

Üks olulisemaid aspekte mullaelustiku molekulaarse tuvastamise juures ja selle kasutamisel seires, on vajadus erioskustega inimeste järele. Kuigi üldiselt võib neid inimesi kirjeldada molekulaarbioloogidena, siis praktikas vajalikud oskused üldjuhul ühes isikus ei avaldu. Nii oleks ülikoolidest sõltumatuks uuringute läbiviimiseks vaja vähemasti molekulaaruuringute taustaga laboranti, bioinformaatikut, andmeteadlast ja viimaks ka ökoloogi, kes saadud andmeid laiemasse konteksti asetaks ning neist järeldused teeks. Nõudlus selliste oskustega inimeste järele on suur ka teistes sektorites, mistõttu ei pruugi nende leidmine olla lihtne ja võib vajada teistsugust lähenemist, näiteks olemasoleva personali täiendkoolitamist, eriti olukorras kus seire läbiviimine tõenäoliselt neid inimesi täies mahus ei koorma.

4.2 Rakendatavus – mulla biomarker-rasvhapete analüüs

Esimesed raportid rasvhapete biomarkerite kasutamisest pärinevad aastast 1979 kui neid kasutati meresetete mikrobiaalse biomassi hindamiseks (White et al., 1979). White ja kaasautorid modifitseerisid ka käesoleva uuringu aluseks olevat Bligh ja Dyeri (1959) protokoll, mis oli algselt mõeldud kasutamisel lipiidide eraldamiseks kaladest. Alates mulla rasvhapete indikaatorväärtuse tõestamisest varajastel 1990ndatel on mulla biomarker-rasvhapete analüüsi kasutatud sadades teaduspublikatsioonides krohmseente tuvastamiseks (Olsson ja Lekberg, 2022) ning tõenäoliselt tuhandetes mikroobikoosluste uuringutes. Ka plahvatuslikult arenevate DNA-põhiste meetodikate tulekuga ei ole rasvhapete analüüsi seni suudetud asendada samaväärselt informatiivse ning ressursitõhusa mõõdikuga mulla mikroobikoosluse biomassi

hindamiseks. See näitab, et kuigi kronoloogiliselt on tegu küllalt vana metoodikaga, ei ole selle väärtus ajas kahanenud ning see on endiselt laialdaselt rakendatav nii ökoloogias kui sellega seotud teadusharudes.

Informatiivsus

Uuringu tulemused näitavad, et mulla biomarker-rasvhapped on iseseisvalt informatiivsed suuremate nihete tuvastamiseks mulla mikroobikoosluses, pikaajaliste aegridadena ja komplementaarse infoallikana teiste mullaelustiku analüüside kõrval. See tähendab, et pigem on metoodika eraldiseisvalt sobilik seireesmärkide täitmiseks, kuid mitte viljelusviiside omavaheliseks võrdlemiseks, kuivõrd need ei mõjuta mulla mikroelustiku moodustavate organismirühmade biomassi. Nii ei leitud näiteks antud uuringus mullaelustiku biomasside vahel erinevusi mahe- ja tavaviljeluses, kuid see ei välista, et neid erinevusi ei esine teiste praktikate vahel, näiteks mullahäiringute gradiendil. Seetõttu on uute taustaandmete lisandudes mõistlik ka käesoleva uuringu tulemused teiste praktikate kontekstis tulevikus üle vaadata.

Mulla mikroobikoosluse struktuur, kuivõrd need tulenevad individuaalsete rasvhapete kontsentratsioonidest, on üldiselt vähe-informatiivne. Koosluste analüüsimisel arvestatakse iga koosluse moodustava osise proportsionaalset osa koosluse tervikus. Seetõttu on mulla rasvhapetel põhinev nn kooslus oma kirjeldavatelt omadustelt piiratud selle osiste hulgaga, mis on muutumatu. See on suureks kontrastiks DNA põhisele kooslusele, kus lisaks liikide suhtelistele ohtrustele on muutustes nii liikide arv kui liikide identiteet, mis võimaldab oluliselt suuremat koosluse variatsiooni ja seeläbi informatiivsust. Seetõttu võib öelda, et mulla rasvhapetel põhinev koosluse ja selle muutuste hinnang on võrreldes DNA põhiste kooslustega piiratud ning suuremat tähelepanu väärivad muutused organismirühmade piires.

Aegpüsivus

Mulla biomarker-rasvhapete analüüse on läbi viidud vähemalt viimased kolmkümmend aastat. Selle aja jooksul on paranenud arusaam sellest, millised markerid on informatiivsed erinevate organismirühmade osas, kuid on avaldatud ka uuringuid, mis lükkavad ümber varasemaid teadmisi ning soovivad osasid markereid mitte kasutada, kuna on selgunud, et need pole piisavalt spetsiifilised (nt. Olsson ja Lekberg, 2022). Olenevalt analüütilise võimekuse arengust on laienenud ka määratavate rasvhapete nimekiri, kuid see ei ole tingimata kasvanud

metoodika informatiivsust, kuna tihti ei ole teada kas uued määratavad ühendid on indikatiivsed spetsiifilise organismirühma osas või on nad universaalsed mitmetes. Seega võib järeldada, et biomarker-rasvhapete analüüsi metoodika on aegpüsiv ning areng ei sõltu niivõrd tehnilistest edasiminekutest, vaid teadusuuringute avastustest ühendite indikatiivsuse osas. Seetõttu võib eeldada, et tulevikus marker-rasvhapete nimekiri laieneb ja muutub, kuid see ei muuda analüüsi olemust ei tehniliselt ega sisuliselt. Lähtudes mulla bioloogilise seisundi seire vajadustest, on biomarker-rasvhapete analüüs kasutatav tõenäoliselt veel pika aja vältel. Samuti on võimalik määratavate ühendite indikatiivsuse muutudes varasemad andmed üle hinnata, kuna tõenäoliselt on nad tehniliselt määratud ka varasemalt.

Infrastruktuur

Mulla biomarker-rasvhapete määramiseks vajalik infrastruktuur koosneb peamiselt füüsilisest keskkonnast ja laboriseadmetest. Mittemateriaalseid varasid, näiteks andmebaase, pole analüüsi läbiviimiseks vaja kasutada. Seetõttu on analüüs ja tulemused vähe sõltuv pidevast andmebaaside arengust ning täienemisest.

Materiaalne infrastruktuur koosneb põhiosas rasvhapete ekstraheerimiseks ja derivatiseerimiseks minimaalselt vajalikest laboriseadmetest (täielik nimekiri vajalikest seadmetest ja tarvikutest on esitatud Lisa 2). Baastasemel on tegemist suhteliselt lihtsa labori-infrastruktuuriga ning rasvhapete eraldamine ja derivatiseerimine võib toimuda ka teiste mulla-analüüsidega samades ruumides, kuna ristsaastuse oht on madal. Kulukam ning infrastruktuuri osas nõudlikum on gaasikromatograafil derivatiseeritud proovide analüüs. Gaasikromatograafid leek-ionisatsiooni detektoriga maksavad suurusjärgus 30 000 – 50 000 eurot, arvestamata lisaseadmete (nt vesiniku generaator, autosampleri modifikatsioonid) ja gaasivarustusega (lämmastik ja heelium) seotud kulusid. Samas on gaasikromatograaf laia kasutusotstarbega ning sageli keskkonnaanalüüsi läbi viivates asutustes juba olemas. Sellisel juhul piirduvad kulud vaid biomarker-rasvhapete jaoks sobiliku kapillaarkolonne soetamise ja seadmete püsikuludega.

Inimressurss

Mulla biomarker-rasvhapete laboratoorne määramine nõuab kahtlemata analüütilise keemia alast ettevalmistust, kuid vajalike oskustega tippspetsialistid on näiteks Põllumajandusuuringute Keskuse laboratooriumides olemas. Seega oleks mulla biomarker-rasvhapete analüüs

läbiviimiseks mõistlik olemasolevaid spetsialiste täiendkoolitada. Probleemaatiliseks võib osutuda nende spetsialistide olemasolev töökoormus, kohustused ja selle jaotus ajas – biomarker-rasvhapete eraldamine ja derivatiseerimine võtab olenevalt proovide arvust aega mitu nädalat ning selle aja jooksul on keeruline täita teisi jooksvaid tööülesandeid. Seetõttu oleneb personalivajadus eeskätt töökoormuse jaotamise võimalusest ning perspektiivsest proovide arvust aastas. Tulemuste analüüsimisel ja tõlgendamisel on kasuks multivariaatse statistika aluste tundmine ning taust mulla- ja üldökoloogias, spetsiifilisemate järelduste puhul ka teadmine kirjeldatavate organismirühmade bioloogiast.

4.3 Metoodikate võrdlus

Uuringus kasutatud metoodikate praktiliste aspektide omavaheline võrdlus on esitatud Tabelis 5. Võrdluses välja toodud kirjeldused põhinevad projekti täitja kogemustele ning võivad detailides erinevate laborite lõikes varieeruda. Nii sõltub näiteks metoodikate rakendamise kulukus suuresti rakendava labori olemasolevast sisseseadest ja metoodika rakendamise eesmärgist. Niisamuti mõjutab metoodikate rakendamise eesmärk ja analüüsides hulk ka üksikanalüüsides hinda ja selleks kuluvat tööaega. Üldjuhul kehtib põhimõte, kus proovide arvu suurenedes väheneb analüüsides omahind ning kirjeldatud analüüsid pole siinpuhul erandiks. Nii on näiteks võimalik biomarker-rasvhapete analüüsil töötada ka väiksemate proovide arvuga (sh ühe kaupa), kuid analüüsi omahind on sel juhul ligi kaks korda suurem ning tööaeg vaid kolmandiku võrra lühem kui 96 proovi analüüsil.

Tabel 5. Mulla biomarker-rasvhapete ja molekulaarse mullaelustiku määramise meetodite omavaheline praktiliste aspektide võrdlus.

	Molekulaarne mullaelustiku määramine	Mulla biomarker-rasvhapete analüüs
Metoodika aegpüsivus	Madal – metodoloogilised aspektid on ajas muutuvad.	Kõrge – metoodika on muudatusteta rakendatav pika aja jooksul.
Läbiviimiseks vajalike spetsiifiliste oskuste osakaal	Kõrge – laboratoorne analüüs vajab molekulaarbioloogia taustaga spetsialisti; bioinformaatiline andmetöötlus vastavate teadmiste ja kogemustega spetsialisti; andmeanalüüs multivariaatse statistika meetodite valdamist. Tulemuste tõlgendamisel on kasuks taust ökoloogias ning spetsiifiliselt uuritava organismirühma bioloogias.	Keskmine – laboratoorne analüüs vajab analüütilise keemia taustaga spetsialisti; andmeanalüüs multivariaatse statistika meetodikate tundmist. Tulemuste tõlgendamisel on kasuks taust ökoloogias spetsiifiliselt uuritavate organismirühmade bioloogias
Üles-seadmise kulukus	Keskmine kuni kõrge – mullast DNA eraldamise ja sekveneerimiseks ettevalmistamise aparatuur on tavapärane keskkonna-analüüse läbiviiva labori sisseseade, v.a PCR masinad ja geel-elektroforeesi tarvikud.	Keskmine – rasvhapete eraldamise ja derivatiseerimisega seotud aparatuur on tavapärane keskkonna-analüüse läbiviiva labori sisseseade. Kulukaim on aparatuuri osas gaasikromatograaf,

	Tagada tuleb puhtus (vajadus eraldiseisvate ruumide jaoks eraldamise ja PCR töödele). Juhul kui sekveneerimine soovitakse teha majasiseselt, on suurimaks kuluks sekvenaator, hinnanguliselt 100 000 – 200 000 € (Illumina MiSeq sekvenaator, olenevalt spetsifikatsioonist). Lähtuvalt metoodika aegpüsivusest, soovitavad uuringu autorid sekveneerimisteenust allhankida.	hinnanguliselt 30 000 – 50 000 €.
Sobilik proovide arv ühes analüüsis	350, tuleneb Illumina sekveneerimisjooksus kasutatava kiibi välja antavast sekventsides arvust ja ühte DNA raamatukokku koondatavate proovide arvust ning võimalike raamatukogude sekveneerimise arvust ühel kiibil.	96 (184), on määratud kõrge läbilaskvusega metoodika spetsiifikast, kasutades 96 kaevuga mikroplaate. Otstarbekas on ühekorraga töötada ühe või kahe mikroplaadiga (ühel inimesel)
Laboratoorseks tööks kuluv hinnanguline tööaeg (1 inimene)	12 tööpäeva; sisaldab endas proovide kaalumist, DNA eraldamist, PCR	12 (20) tööpäeva; sisaldab endas proovide kaalumist, rasvhapete eraldamist,

	reaktsioone ja geel- elektroforeesil jooksmist. Juhul kui amplikonide raamatukogud valmistatakse sekveneerimiseks ette majasiseselt, tuleks lisada 2-5 päeva, olenevalt kasutada olevate PCR masinate arvust.	fraktsioneerimist ja derivatiseerimist ning kromatograafiaks ette valmistamist.
Analüüsiks kuluv ligikaudne aeg	30 tundi sekvenaatori tööaega. Allhankena olenevalt sekveneerimisfirmast kuni paar nädalat	6 (12) ööpäeva; gaasikromatograafi tööaeg, kuid vajab perioodilist järelvalvet. Samal ajal võimalik teha teisi töid.
Ühe aalüüsi ligikaudne maksumus proovi kohta (omahind tööjõukuluta)	~ 63 € (32 € DNA eralduskiti kulu, 25 € proovide ettevalmistus, 6 € sekveneerimiskiip, arvestamata püsikulused, seadmete amortisatsiooni jmt)	~ 12 € (arvestamata gaasikromatograafi püsikulused, seadmete amortisatsiooni jmt)
Rakendusvõimalus massanalüüsina	Jah – laboratoorse töö etapid on skaleeritavad. DNA eralduse saab viia üle ka väiksematele mulla kogustele, kiirendades tunduvalt protsessi, kuid vajab verifitseerimist. DNA	Jah – laboratoorse töö etapid on skaleeritavad. Gaasikromatograafial on võimalik kasutada „kiiremaid“ kolonne.

	eralduseks on võimalik kasutada robotit.	
Vajab spetsiifilist mullaproovide kogumise metoodikat?	Jah - proov tuleb koguda steriilselt ning kuivatada kiiresti kasutades vett-imavat ränigeeli. Proovivõtjate koolitus on vajalik.	Jah – proov tuleb koguda puhtalt ning kuivatada kiiresti kasutades vett-imavat ränigeeli. Proovivõtjate koolitus on vajalik.

4.4 Nõuded mullaproovide kogumiseks ja säilitamiseks

Käesolevas uuringus molekulaarselt ja biokeemiliselt analüüsitud mullaproovid on kogutud ühtse metoodika alusel. Kui molekulaarsete analüüside tarvis on Tartu Ülikooli botaanika osakonnas proove kogutud aastaid sama metoodika alusel, siis biomarker-rasvhapete analüüsiks on varasemas kirjanduses proovide elustiku fikseerimiseks välja pakutud vaid kiire proovide külmutamine, seejuures juba välitöödel. Kuna mullaproovide külmutamise vajadus muudab proovivõtu tülilaks ning aeganõudvaks, asus 2020. aastal TÜ Keemia Instituudi ja botaanika osakonna kaasjuhendamisel oma magistritöös proovide kogumise ja säilitamise metoodikaid uurima Manju Kasaju (Kasaju, 2021).

Magistrant katsetas kolme erinevat mullaproovi ettevalmistuse metoodikat (külmutamine ja seejärel lüofiliseerimine, kuivatamine ränigeeli abil, kuivatamine pöördõhuga kuivatuskapis 50°C) neljas erinevas ajaviibes (kohene töötlemine, töötlemine 8h pärast, töötlemine 24h pärast, töötlemine 48h pärast) kahes maakasutuse tüübis (poollooduslik rohumaa, külvikorras olev põld). Saadud tulemuste põhjal selgus, et proovi ettevalmistuse metoodika on väheoluline, kuid proov peab saama kuivatatud hiljemalt 8h pärast proovi kogumist (samal päeval kogumisega), seejuures olenemata kuivatamise viisist (kuivatamine kuivatuskapis, ränigeelis või külmutamine). Hilisema töötlemisega muutub mulla biomarker rasvhapete koostus oluliselt. Seetõttu on soovitatavaks proovide töötlemise metoodikaks biomarker-rasvhapete analüüsil mullaproovi kuivatamine ränigeeli abil, mis võimaldab kuivatamist alustada juba proovi kogumisel välitingimustes. Ränigeeli kasutamise eelis tuleneb ka sellest, et samadest

mullaproovidest (eelduseks steriilne kogumine) on võimalik teha ka molekulaarseid analüüse. Seetõttu on PMK-s rakendatav mullaproovide kogumise standardmetoodika rasvhapete analüüsiks ebasobiv, kuna proovid jõuavad kuivatamisele liiga suure ajalise viibega ning proovide kogumisel pole puhtus täielikult garanteeritud.

Antud projekti raames koostati Põllumajandusuuringute Keskuse proovivõtjatele vajalikud proovide kogumise näidiskomplektid, mis koosnesid vajalikul hulgal pakkematerjalist, silikageelist ja juhendmaterjalist. Pärast lühidat koolitust proovivõtu metoodikast tulid proovivõtjad uue metoodika alusel proovide kogumisega hästi toime ning saadud andmete kvaliteedis probleeme ei esine. Seetõttu võib kinnitada, et uus proovide töötlemise metoodika on nii molekulaarsete kui biokeemiliste mulla-analüüsides teostamiseks vajalik, kuid selle elluviimine ei too endaga tõenäoliselt kaasa olulisi probleeme. Antud metoodika on sobilik nii edasisteks mulla DNA-i põhinevateks analüüsides kui ka rasvhapete biomarkerite sisalduste määramiseks (Lisa 5).

5 SOOVITUSED INDIKAATORI EDASIARENDUSEKS

Molekulaarne mullaseente määramine ja mulla biomarker-rasvhapete analüüs kannavad endas olulist informatsiooni ning on perspektiivikad rakendamiseks nii seires kui ka analüüsiteenusena mulla kasutajatele. Sellegi poolest on võimalik ka kirjeldatud metoodikates vähendada juhuslikku variatsiooni ning tõsta tulemuste usaldusväärsust. Järgnevalt kirjeldatakse põhilisi aspekte mille edasine uurimine aitab nii seiret kui ka juhuanalüüse paremini planeerida, tõlgendada ja läbi viia: i) muutused mullaelustiku profiilis lähtuvalt looduslikust fenoloogiast; ii) proovivõtu skeemide arendus suurendamaks mullaproovi esinduslikkust; iii) referents-alade võrgustiku vajaduste kaardistamine; iv) alternatiivsete rRNA regioonide kasutamine teiste mullaelustiku rühmade määramiseks; v) funktsionaalsete mõõdikute lisamine hinnatavate parameetrite nimistusse.

- i) Antud uuringu tulemused viitavad, et tulemuste aastate vaheline variatsioon võib olenevalt mõõdikust olla madal kuni kõrge. Varasemas teaduskirjanduses on toodud välja, et mulla DNA puhul on sesoonne variatsioon pigem väiksem kui ruumiline (Carini et al., 2020), kuid Eesti kontekstis pole seda testitud. TÜ taimeökoloogia töörühmas on käimas uuring, mis keskendub mullaseente elurikkuse ruumilise variatsiooni määrale põllumassiivi sees (oodatav valmimisaeg 2023). Mulla erinevate organismirühmade biomassi osas sarnaseid uuringuid käimas ei ole, kuid varasemates uuringutes on suurem aasta sisene variatsioon leitud kogu biomassi ja bakteriaalse biomassi osas (Moore-Kucera & Dick, 2008). Edasiste sammudena oleks otstarbekas antud teadmiste lünka täita asjakohaste andmetega Eestist, kuid kirjandusele tuginedes ei tohiks need olla takistuseks seiretegevuse alustamiseks.
- ii) Käimasolevad uuringud TÜ taimeökoloogia töörühmas näitavad, et mulla seeneelustiku liigirikkuse variatsioon ruumis põllumassiivi piires on kõrge. Selle põhjused ei ole veel selged, kuid tõenäoline on koosmõju nii mulla parameetrite, maastiku struktuuri kui ka ajaloolise maakasutusega. Kuigi ruumilise variatsiooni mõju tulemustele on suure tõenäosusega olemas (uuringud pole lõppenud), ei ole seire kontekstis selge, kas seda tuleks minimeerida, või oleks vaja kirjeldada massiivide mulla bioloogilist seisundit ka ruumis. Rohkem kui lisauuringuid, on selle

- küsimuse välja selgitamiseks vaja seire eesmärkide täpsustamist ning seotud ametkondade vahelisi kokkuleppeid valitava metoodika osas. Ruumilised mullaelustiku seisundi hinnangud toovad endaga kaasa ka oluliselt suuremad kulud, kuna vajalik proovide arv põllumassiivi kohta on suurem.
- iii) Lähtuvalt antud uuringu tulemustest, kus selgub, et mõõdetud mullaelustiku parameetrite aastate vaheline variatsioon võib olla suur, ei sobi loodud andmestik referentsiks massanalüüside läbiviimisel. Referentsalade mullaelustiku parameetrid peavad kirjeldama mullaelustiku seisundit antud kliimaatilisel aastal, olemata seejuures liialt mõjutatud inimtegevusest (nt erinevad kultuurid, väetised, mullaharimine). Kuna kliimaatilised tingimused on üle Eesti ebaühtlased, peaks neid referentsalasid olema üle Eesti, või vähemalt olulisemates põllumajanduspiirkondades. Kaaludes huvialuse põllumassiivi analüüside tulemused läbi sama piirkonna referentsalade tulemustega, on potentsiaalselt võimalik anda hinnang massiivi mullaelustiku seisundile antud vegetatsiooniperioodi kliimaatilisi tingimusi arvestades. Referentsalade võrgustik peaks katma olulisemad Eesti põllumajanduspiirkondi ning mullastikuvaldkondi. Perspektiivikaks valikuks võiksid olla näiteks mineraalmuldadel ja pidevas hoolduses poollooduslikud niidud. Lühikeses perspektiivis, enne kui referentsalade võrgustiku põhimõtted on välja selgitatud, saaksid sarnast funktsiooni täita riikliku mullaseire püsialad.
- iv) Mullas elavate seente elurikkust kirjeldavad parameetrid on kasutusel laialdaselt nii teaduses kui ka teistes suureskaalalistes seireinitsiatiivides, nagu näiteks LUCAS (Orgiazzi et al., 2022), mille DNA põhised elurikkuse analüüsid on mh läbi viidud Tartu Ülikoolis. LUCAS uuringus kasutati mulla elurikkuse kirjeldamiseks nii käesolevas uuringus kasutatud ITS markerregiooni seente tuvastamiseks, kui ka 16S ja 18S regioone bakterite ja üld-eukarüootide tuvastamiseks. Perspektiivis oleks otstarbekas Eesti riiklik mullaseire siduda samade organismirühmade marker-regioonidega mis on olnud kasutusel LUCASe üle-Euroopalises initsiatiivis (16S arhed PacBio Sequel, 16S bakterid Illumina MiSeq, ITS seened PacBio Sequel, 18S üld-eukarüoodid Illumina MiSeq). LUCASe uuringus on kasutatud pikemat ITS regiooni amplokoni PacBio sekveneerimistehnoloogiaga, ning sellise sekveneerimismetoodikaga saadud andmed on täitjal muude projektide raames

olemas ka varasema KIK projekti 218 ala kohta ning seega vajadusel kasutatavad. PacBio sekveneerimistehnoloogia eeliseks on pikemad lugemid mis pakuvad mõningates seeneperekondades paremat liigilist resolutsiooni; miinuseks kõrgem hind ja teenusepakkuja puudumine Eestis. Markerite valiku laiendamine, selle otstarbekus ja informatiivsus, tuleks välja selgitada sellekohaste uuringutega.

- v) Mullaelustiku biomass ja mitmekesisus mõjutavad mulla funktsioone (Wagg et al., 2014). Kuigi elurikkusel on ka oma fundamentaalne väärtus, on põllumajanduslikes süsteemides olulised eelkõige mulla elurikkuse poolt pakutavad hüved ja ökosüsteemi funktsioonid. Nendeks funktsioonideks võivad olla nii süsiniku sidumine, toiteainete vabastamine taimejäänustest, toiteainete mullas hoidmine (leostumise takistamine), toiteainete transport mutualistlikes suhetes, mulla-agregaatide moodustamine, aga ka näiteks ökosüsteemi hüved nagu kliima regulatsioon (heitmed ja sidumine), kahjurite looduslike vaenlaste elupaiga pakkumine jpm. Seni ei ole Eestist komplekselt kogutud mulla elurikkuse ja sellega seotud funktsioonide andmeid, mistõttu on nende omavaheline sidumine keeruline. Funktsionaalsete parameetrite sidumine mullaelustiku elurikkuse ja/või biomassiga annaks nii poliitikaloomele kui ka majandajatele täiendavad hoovad oma otsuste tegemiseks ja põhjendamiseks. Praktilisest küljest oleksid kiiremini rakendatavad indikaatorid näiteks taimejäänuste lagundamise kiirus ja mulla-agregaatide stabiilsuse hinnangud. Perspektiivis tuleks oluliseks pidada mulla elurikkuse kontekstis ka mulla võimet süsinikku siduda ning mullast lähtuvaid kasvuhoonegaaside heitmeid, mis on seni põllumuldadel ebapiisavalt kirjeldatud, sh LULUCF määrase kontekstis.

6 INTEGRATSIOON RIIKLIKU MULLASEIREGA

Riikliku keskkonnaseire programmi mullaseire allprogramm (RT I, 25.01.2017, 9, § 3) kirjeldab hästi tänase mullaseire tegevusi ja vajakajäämisi, milles mullaelustiku kui mulla ühe aluskomponendi seiresse kaasamata jätmine on seadnud küsimuse alla ka mitmete teiste seireprogrammide eesmärkide ja ülesannete täitmise (sh bioloogilise mitmekesisuse seire, kompleksseire, põhjaveeseire, metsaseire).

Kuigi uuringus kasutatud meetodikatel on kahtlemata oma tugevused ja puudujäägid, ei ole nende rakendamisel riiklikus mullaseires sisulisi takistusi. Projekti tulemused näitavad, et rakendatud meetodikad kannavad endas mõnevõrra erinevat informatsiooni, kuid selle põhjal tehtavad järeldused mullaelustiku seisundi kohta on sarnased. Siiski on nii mulla biomarker-rasvhapete analüüs kui ka molekulaarne mulla seene-elustiku määramise analüüs teineteist täiendavad – esimene annab laia ülevaate mullaelustiku struktuurist, teine täpsema, organismirühmade haaratuses piiratuma, ent taksonoomiliselt konkreetse sissevaate mulla ühest kesksest elustikurühmast.

Kuna seire eesmärk on olla pidev ja pikaajaline, oleks mõlema meetodika rakendamine perspektiivikas. Iseäranis seetõttu, et selliselt oleks tagatud ajakohased referentsandmed ka mõlema analüüsi pakkumiseks põllumajandustootjatele ja teistele huvilistele, vähemalt seni kuni referentsalade võrgustikku veel üles seatud pole. Nagu 5. peatükis kirjeldatud, on üle-eestiline andmestik kahtlemata väärtuslik nii käesoleva kui ka tuleviku uuringute kontekstis, kuid vajab enda kõrvale nn kalibratsiooniandmestikku juhuanalüüsideks ja seireandmete täielikumaks tõlgendamiseks. Mulla bioloogiliste parameetrite määramisel oleks kahtlemata väärtus ka tänaste seirealade piires, kuid kindlasti tuleks esinduslikkuse saavutamiseks seirealade arvu tõsta ning seda mitte ainult põllumuldade, vaid ka teiste elupaigatüüpide osas. 2020. aastal läbi viidud KIKi uuringus leiti, et 218 prooviala kokkuvõttes kirjeldati vaid ligikaudu pool tõenäolisest tegelikust seente elurikkusest Eesti põllumuldades (Vahter et al., 2020). Seetõttu võib oletada, et 27 riikliku mullaseire püsiala mullaelustiku seirel tehtaks järeldused vaid väikese liigikomplekti põhjal mis tegelikkuses ei kirjelda Eesti muldade mitmekesisust. Seetõttu tuleks perspektiivis ette näha seirealade arvu märkimisväärt tõstmist, mis vajab ka seireks ette nähtavate investeeringute ja püsikulude tõstmist.

Mulla bioloogilise seisundi seire alustamise korralduslikud väljakutsed on seotud personali täiendkoolituse, infrastruktuuri ja selle loomiseks vajalike rahaliste vahendite ning seire läbiviimise rahaliste vahendite olemasoluga. Kuigi uuringu koostajad ei ole läbi viinud Põllumajandusuuringute Keskuse või peagi loodava ühendasutuse Maaelu Teadmuskeskuse personali ja infrastruktuuri inventuuri, on tõenäoline, et vastav tehnoloogiline võimekus on asutuse allüksuste seas olemas. Seetõttu on peamiseks praktiliseks väljakutseks rahaliste vahendite ja spetsiifilise personalivajaduse katmine.

7 KOKKUVÕTE

Eestis puudub piisav ülevaade põllumuldade bioloogilisest seisundist ning nende andmete puudumine pärsib asjakohase põllumajanduspoliitika kujundamist ning põllumajandustootjatel majandamisotsuste langetamist. Ühtlasi on pärsitud põllumajandusvaldkonna strateegiliste eesmärkide saavutamine. Seire läbiviimist on seni takistanud asjakohase mõõdiku ja andmete kogumise metoodika (sh andmete interpreteerimise) puudumine.

Uuringu eesmärgiks oli välja töötada Eesti muldade seisundit võimalikult täpselt iseloomustav mullaelustiku ja -elurikkuse mõõdik(ud) ning selle esialgne interpreteerimine. Antud uuringus võrreldi biomarker-rasvahapete meetodit nukleiinhapete tuvastamisel põhinevate meetoditega, eesmärgiga arendada välja metoodika muldade mikrobioomi seisundi hindamiseks.

Uuringus toetuti KIK projekti nr 15499 “Põllumajandusliku maakasutuse mõju mullaelustikule: seened mulla bioloogilise seisundi indikaatorina“ raames 2019. aastal kogutud andmestikule ning muuhulgas kasutati analüüsideks seal kogutud mullaproove. Lisaks koguti 2021. aastal mullaproovid 51 uuel uuringualalt ning viidi läbi kordusmõõtmised 24 riikliku mullaseire püsialal. Kõigist kahel uuringuaastal kogutud mullaproovidest (293) määrati DNA põhine seente elurikkus ning biomarker-rasvahapete põhised seente, krohmseente ja bakterite biomassid. Saadud tulemuste informatiivsust hinnati kvalitatiivselt läbi meetodite võime kirjeldada maakasutusest ja viljelusviisist tulenevaid erinevusi mullaelustikus. Lisaks hinnati erinevate meetoditega määratud parameetrite lühiajalist variatsiooni kordusproovide põhjal mullaseire püsialadel.

Uuringu tulemused näitasid, et mullaseente DNA-põhised liigirikkuse hinnangud on informatiivsed eristamaks nii maakasutusest kui ka viljelusviisidest tingitud muutusi mulla mikrobioomis. Koosluste tasemel olid muutused olulised, kuid väikese mõjuga ning tõid esile märkimisväärse variatsiooni kahe proovide kogumise aasta vahel. Sellele vaatamata olid kahel erineval aastal kogutud proovide seenekooslused üksteisega tugevalt korreleerunud. Üle kõigi analüüsides pakkus seeneliikide troofiliste rühmade eristamisvõime juurde lisavõimalusi andmete interpreteerimiseks, näiteks sümbiootiliste krohmseente või haigustekitajate liigirikkuse muutudes. Metoodika sobilik nii pikaajaliste, kui ka kiirelt aset leidvate muutuste tuvastamiseks mulla seenekoosluses, kuid tulevikus tuleks pöörata tähelepanu aastate vahelise variatsiooni

määra kontrollimisele. Metoodika tugevusteks on andmete suur hulk, informatiivsus ja arengupotentsiaal; nõrkusteks andmetega töötamise keerukus ning analüüside kulukus.

Määratud mulla biomarker-rasvhapetel põhinevad seente, krohmseente ja bakterite biomassid näitasid võimet eristada suuremaid erinevusi maakasutuses, kuid mitte viljelussüsteemides. Sellest ei saa aga järeldada, et metoodika täpsus oleks selleks otstarbeks ebapiisav, vaid on võimalik, et nende organismirühmade biomassid ongi viljelussüsteemide vahel sarnased. Rasvhapetel põhinevad mullaelustiku kooslused ei olnud vähese variatiivsuse tõttu uuritud seletavate parameetrite osas informatiivsed, kuna rasvhapetel põhinevates koosluse analüüsides ei saa eristada troofilisi gruppe ning andmete hulk proovi kohta on madal. Rasvhapetel põhinevad biomassid olid kahe proovide kogumise aasta vahel üsna stabiilsed, kuid määratud mikroorganismide gruppides võisid erinevused olla märkimisväärsed – nii oli näiteks krohmseente biomass 2021. aastal keskmiselt oluliselt madalam kui samadel aladel 2019. aastal, jäädes sageli alla määramispiiri. Alla määramispiiri tulemused võivad aga tekitada probleeme andmeanalüüsis ning mõjutada ebaproportsionaalselt ka teisi sellega seotud parameetreid, näiteks seente ja bakterite biomasside omavahelist suhet. Seega sobib metoodika pikaajaliste trendide jälgimiseks mulla mikroobikoosluses, krohmseente biomarkerit kasutades ka kiiremate muutuste kirjeldamiseks. Metoodika tugevusteks on selle analüütiline iseloom, andmete lihtsus ja informatiivsus, suure osa mulla mikroobikoosluse organismide haaratus, suhteline laboratoorse analüüsi lihtsus ja madalam andmete omahind; nõrkusteks vähene diferentseerimisvõime organismirühmade troofilistes tasemetes, tundlikkus alla määramispiiri tulemuste osas ja vähene potentsiaal metodoloogilisteks edasiarendusteks.

Erinevate metoodikate abil saadud tulemuste omavahelisel võrdlemisel selgus, et mulla DNA põhine seente elurikkuse mõõtmine ja biomarker-rasvhapete põhine mullaelustiku biomasside hindamine on oma olemuselt komplementaarsed, võimaldades üldiselt teha sarnaseid järeldusi, kuid kandes detailides erinevat infot. Kuna nii liigirikkusel, liikide identiteedil ja eluviisil, aga ka biomassil on funktsionaalsed ja ökoloogilised tagajärjed, saab mõlema metoodika komplementaarsel kasutamisel kõige täielikuma andmestiku edasisteks järeldusteks.

Edasised uuringud peaksid keskenduma mullaelustiku looduslikust fenoloogiast tingitud variatsiooni kirjeldamisele, referentsalade võrgustiku vajaduste kaardistamise, alternatiivsete rRNA regioonide informatiivsuse uurimise ja funktsionaalsete mõõdikute lisamise võimalustele.

Uuritud metoodikate integratsiooniks riikliku mullaseirega ei ole sisulisi takistusi, kuid perspektiivis tuleks pöörata suuremat tähelepanu seire- ja referentsalade võrgu arendusele. Kuna erinevatel aastatel valitsenud ilmastikuolud ja agronoomilised tingimused mõjutavad teatud määral mullaelustiku parameetreid, on tulemuste tõlgendamiseks oluline seada üles looduslikku fenoloogiat kirjeldav, kuid pikaajaliselt stabiilse elurikkusega referentsalade võrgustik. Eeskätt on see oluline potentsiaalseks mullaelustiku seisundi hindamise teenuse pakkumiseks põllumajandustootjatele, kuna nendel juhtudel on aegriidade ja pikaajaliste trendide kõrval oluline ka kohene olukorra hindamine. Kaaludes huvialuse põllumassiivi analüüside tulemused läbi sama piirkonna referentsalade tulemustega, on potentsiaalselt võimalik anda hinnang massiivi mullaelustiku seisundile antud vegetatsiooniperioodi kliimaatilisi tingimusi arvestades. Referentsalade võrgustik peaks katma olulisemad Eesti põllumajanduspiirkondi ning mullastikuvaldkondi. Suuremat potentsiaali omavad seejuures püsivalt majandatavad poollooduslikud niidukooslused, eeskätt oma rikkaliku mullaelustiku ja vähese majandamisintensiivsuse tõttu.

Praktilised väljakutsed metoodikate rakendamiseks on peamiselt seotud rahaliste vahendite ja erioskustega personali leidmisega. Mulla bioloogilise seisundi hindamise metoodikate rakendamine seires ning teenuste välja arendamine massanalüüsideks nõuavad täiendavaid investeeringuid infrastruktuuri ning personali täiendkoolituseks või värbamiseks. Enne metoodikate rakendamise otstarbekuse hindamist või nende vahel valimist oleks otstarbekas laiemalt üle hinnata ja täpsustada realistlikud riikliku mullaseire allprogrammi eesmärgid, integratsioon teiste seireprogrammidega ja tegevuskava nende eesmärkide täitmiseks.

Muld on taastumatu loodusvara mis on tekkinud elus- ja eluta looduse vastastikusel toimel ning on aluseks meie elule Maal. Muldade heast käekäigust ja seisundist sõltuvad nii biogeokeemilised aineringsed, kliima regulatsioon kui ka meie toiduturvalisus. Seetõttu on oluline, et muldade füüsikaliste ja keemiliste omaduste kõrval omaksime arusaama ka oma tegude mõjudest mulla elusosale ning oskaksime looduse üht olulisemat kapitali ka jätkusuutlikult kasutada.

8 SUMMARY

With no comprehensive overview of the biological status of agricultural soils in Estonia, there are clear obstacles to decision-making at both policy and farm management levels – also a roadblock to the fulfilment of long-term strategical goals. The factors contributing to the lack of specific soil biota monitoring schemes have been the ongoing search for suitable indicators and methodologies for practical implementation.

The overarching goal of this study was to develop and test potential candidate methodologies for assessing the status of soil biota in Estonian farmland soils. Here, parallel analyses of DNA-based soil fungal communities and fatty-acid biomarkers based soil microbial structure were used to assess the explanatory power and detail of these methods in different farming contexts.

In this study, we used data and soil samples collected in a previous study on Estonian farmland fungal biodiversity, supplemented by an additional sampling campaign in 2021 aimed at covering under-sampled regions. In 2021, we also collected 24 repeated samples from permanent soil monitoring areas sampled in 2019. All the samples from both sampling campaigns (293) underwent DNA-based fungal biodiversity and fatty-acid biomarker-based biomass assessments. We assessed the information gathered by both methods in the context of the ability to differentiate between forms of land-use and specific management regimes. Additionally, we assessed the short-term temporal variability in repeated measurements from the permanent soil monitoring sites.

The results indicate that soil fungal DNA-based biodiversity estimates are informative in discriminating between land use and management-inflicted shifts in soil fungal biota. Changes in soil fungal community composition were significant but small, yet indicated a profound difference between the two sampling campaign years. Nevertheless, the fungal communities of soils collected during the sampling years were strongly correlated. Across all analyses, the capability to differentiate between trophic groups of fungi made it possible to use additional information for the interpretation of results. Therefore, soil fungal DNA metabarcoding proved to be a suitable method for monitoring both short- and long-term changes in soil fungal biota but future efforts should concentrate on assessing the sources of temporal variability in

metabarcoding-based monitoring schemes. The strengths of the DNA-based fungal metabarcoding method are that it provides a large amount of data and has a high potential for further development and refining, whereas the complexity of data and the current cost of analyses can be regarded as a weakness in a monitoring context.

Soil fatty-acid biomarker-based fungal, AM fungal and bacterial biomass was able to discriminate between different land-use types but not farming systems (organic, conventional). This, however, does not imply insufficient accuracy of the method, but rather that the biomass of studied organism groups does not vary significantly between the farming systems. The fatty acid community structure was not informative for management-induced shifts in soil microbial communities. This is likely caused by the insufficient community variability connected with the fixed number of fatty acid variables that form the community. Additionally, as microbial groups are often represented by a single fatty-acid biomarker, the organism groups cannot be separated into communities of their own, further narrowing the explanatory power of fatty acid based communities. It is noteworthy that the biomass estimates were rather stable between the different sampling campaigns. However, specific groups of microorganisms varied more substantially – AM fungal biomarker concentrations were much lower in 2021 than 2019, in many cases falling below detection limit. This can cause problems in further data analyses and interpretation and disproportionally affect other related parameters, such as the fungal to bacterial biomass ratio. Therefore, the fatty-acid biomarker-based methodology is suited for monitoring long-term trends in soil microbial communities. The more responsive group of AM fungi could also be used to detect shifts in a short time span. The strengths of this methodology comprise its analytical nature, simplicity of data and subsequent analysis, the fact that it encompasses a large part of soil microbiota, is comparatively simple in terms of laboratory work and the data produced is not very costly. The weaknesses include the low discriminating power of trophic levels in the community, sensitivity to values below the detection limit and the low potential for further methodology development.

When comparing the two methods used in this study, it is evident that while they come to similar conclusions overall, they differ in their specific outputs and provide complementary information. As species richness, species identity, lifestyle and biomass all have both functional and

ecological implications, the assessment of biomass and species in conjunction will yield complete data for inference with ongoing processes in the soil.

Future studies would be needed to assess the role of natural phenology in short-term temporal variation and how this would impact the possible monitoring outcomes. Mapping of the requirements and possibilities of setting up a base of reference sites and additional rRNA marker regions should also be considered. Where current capabilities and monitoring goals overlap, the inclusion of additional soil functional parameters would be advantageous.

There are no critical obstacles to integrating either of the tested methods into the Estonian national soil monitoring scheme but attention should be given to developing the monitoring network, especially with the necessity for reference areas in mind. As the climatic and agronomic conditions of a given year do, to an extent, affect the soil biotic component, it would be useful to have a selection of reference areas that reflect the yearly and seasonal variation but are not affected by changes in management. These areas would ideally need to be stable in their soil biodiversity level and not under management-induced ecological succession. This is more relevant in offering analysis services to farmers because this would require meaningful data from the first sampling, not only time series. With a geographically balanced reference area network, the results of a specific field could be weighed in the context of the current year's climatic conditions, yielding a more informative assessment of the current situation. As reference areas, higher priority should be given to seminatural grassland habitats for their diverse soil community and low-intensity but continuous management.

The practical obstacles to applying the tested methodologies are mostly related to funding and the need for personnel with specialized skills. Applying of these methods to monitoring or service-based analyses for farmers require additional infrastructure investments and training for existing personnel or recruiting additional people. Before deciding on how these methods should be implemented or which is the more suitable one, the specific goals of soil monitoring and its links to other monitoring programmes should be re-assessed and aligned with real needs and capabilities. A cross-ministerial soil monitoring development plan is needed to reach these goals, including funding sources, schedule, research plan, milestones, deliverables and responsible entities.

Soil is a non-renewable natural resource that has developed as a result of physical, chemical and biotic processes. Soil forms the basis of our existence on Earth, having a profound role in biogeochemical cycles, climate regulation and food security. Therefore it is important that in addition to soil chemical and physical characteristics we would also have an in-depth understanding of the biotic component of soils and the effects our actions have on it. It is the only way we can ensure that this valuable resource is used sustainably now and in years to come.

KIRJANDUSVIITED

- Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Larsson, K.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjøller, R., Larsson, E., Pennanen, T. and Sen, R., 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. *New phytologist*, 186(2), pp.281-285.
- Balser, T.C., Treseder, K.K. and Ekenler, M., 2005. Using lipid analysis and hyphal length to quantify AM and saprotrophic fungal abundance along a soil chronosequence. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), pp.601-604.
- Bastida, F., Eldridge, D.J., García, C., Kenny Png, G., Bardgett, R.D. and Delgado-Baquerizo, M., 2021. Soil microbial diversity–biomass relationships are driven by soil carbon content across global biomes. *The ISME journal*, 15(7), pp.2081-2091.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), pp.911-917.
- Carini, P., Delgado-Baquerizo, M., Hinckley, E.L.S., Holland-Moritz, H., Brewer, T.E., Rue, G., Vanderburgh, C., McKnight, D. and Fierer, N., 2020. Effects of spatial variability and relic DNA removal on the detection of temporal dynamics in soil microbial communities. *MBio*, 11(1), pp.e02776-19.
- Carini, P., Marsden, P.J., Leff, J.W., Morgan, E.E., Strickland, M.S. and Fierer, N., 2016. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature microbiology*, 2(3), pp.1-6.
- Fischer, M., Bossdorf, O., Gockel, S., Hänsel, F., Hemp, A., Hessenmöller, D., Korte, G., Nieschulze, J., Pfeiffer, S., Prati, D. and Renner, S., 2010. Implementing large-scale and long-term functional biodiversity research: The Biodiversity Exploratories. *Basic and applied Ecology*, 11(6), pp.473-485.
- Frostegård, Å. and Bååth, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 22(1-2), pp.59-65.

- Frostegård, Å., 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(11), pp.3605-3617.
- Gazol, A., Zobel, M., Cantero, J.J., Davison, J., Esler, K.J., Jairus, T., Öpik, M., Vasar, M. and Moora, M., 2016. Impact of alien pines on local arbuscular mycorrhizal fungal communities—evidence from two continents. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), fiw073.
- Guerrieri, A., Bonin, A., Münkemüller, T., Gielly, L., Thuiller, W. and Francesco Ficetola, G., 2021. Effects of soil preservation for biodiversity monitoring using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 30(13), pp.3313-3325.
- Hedrick, D. B.; Peacock, A.; White, D. C. 2005. Interpretation of Fatty Acid Profiles of Soil Microorganisms. *Monit. Assess. Soil Bioremediation*, 5, 251–259.
- Kasaju, M. 2021. Effect of soil sample preparation on fatty acid biomarker content. Magistritöö. Tartu Ülikool, Loodus- ja täppisteaduste valdkond. <http://hdl.handle.net/10062/74410>
- Kohout P, Sudová R, Janoušková M, Čtvrtlíková M, Hejda M, Pánková H, Slavíková R, Štajerová K, Vosátka M, 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.
- Lekberg Y, Vasar M, Bullington LS, Sepp S-K, Antunes PM, Bunn R, Larkin BG, Öpik M. 2018. More bang for the buck? Can arbuscular mycorrhizal fungal communities be characterized adequately alongside other fungi using general fungal primers? *New Phytologist* 220: 971–976.
- Lekberg, Y., Bååth, E., Frostegård, Å., Hammer, E., Hedlund, K., Jansa, J., Kaiser, C., Ramsey, P.W., Řezanka, T., Rousk, J. and Wallander, H., 2022. Fatty acid 16: 1ω5 as a proxy for arbuscular mycorrhizal fungal biomass: current challenges and ways forward. *Biology and Fertility of Soils*, pp.1-8.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550.

- Mardis, E.R., 2017. DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature protocols*, 12(2), pp.213-218.
- Martiny, J.B., Jones, S.E., Lennon, J.T. and Martiny, A.C., 2015. Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective. *Science*, 350(6261), p.aac9323.
- Moore-Kucera, J. and Dick, R.P., 2008. PLFA profiling of microbial community structure and seasonal shifts in soils of a Douglas-fir chronosequence. *Microbial ecology*, 55(3), pp.500-511.
- Oksanen, J., 1996. Is the humped relationship between species richness and biomass an artefact due to plot size?. *Journal of Ecology*, 84(2), pp.293-295.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2020). vegan: Community Ecology Package. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Olsson, P.A., Johansen, A., 2000. Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. *Mycological Research*, 104(4), pp.429-434.
- Olsson, P.A., Thingstrup, I., Jakobsen, I. and Bååth, E., 1999. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(13), pp.1879-1887.
- Orgiazzi, A., Panagos, P., Fernández-Ugalde, O., Wojda, P., Labouyrie, M., Ballabio, C., Franco, A., Pistocchi, A., Montanarella, L. and Jones, A., 2022. LUCAS Soil Biodiversity and LUCAS Soil Pesticides, new tools for research and policy development. *European Journal of Soil Science*, 73(5), p.e13299.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., and R Core Team (2021). {nlme}: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. Available at: <https://cran.r-project.org/package=nlme>.
- Pölme, S., Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Lindahl, B.D., Clemmensen, K.E., Kauserud, H., Nguyen, N., Kjoller, R., Bates, S.T., Baldrian, P. and Frøslev, T.G., 2020. FungalTraits: a user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles. *Fungal Diversity*, 105(1), pp.1-16.

- R Core Team (2021). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available at: <https://www.R-project.org/>.
- Rissanen, A.J., Kurhela, E., Aho, T., Oittinen, T. and Tirola, M., 2010. Storage of environmental samples for guaranteeing nucleic acid yields for molecular microbiological studies. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(4), pp.977-984.
- Rousk, J., Brookes, P.C. and Bååth, E., 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and environmental microbiology*, 75(6), pp.1589-1596.
- Sepp, S.K., Davison, J., Moora, M., Neuenkamp, L., Oja, J., Roslin, T., Vasar, M., Öpik, M. and Zobel, M., 2021. Woody encroachment in grassland elicits complex changes in the functional structure of above-and belowground biota. *Ecosphere*, 12(5), p.e03512.
- Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F. and Van Der Heijden, M.G., 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), pp.5266-5270.
- Vahter, T., Sepp, S-K., Vasar, M., Liu, S., Oja, J., Öpik, M., Astover, A., Penu, P., Tamm, I., Tamm, Ü., Talgre, L., Hiiesalu, I. 2020. Põllumajandusliku maakasutuse mõju mulla elustikule: seened mulla bioloogilise seisundi indikaatorina. Uuringu lõpparuanne. Koostatud SA Keskkonnainvesteeringute Keskuse Keskkonnaprogrammi projekti "Põllumajandusliku maakasutuse mõju mulla elustikule: seened mulla bioloogilise seisundi indikaatorina (15.12.2018–9.12.2020)" raames. Tartu Ülikool, ökoloogia ja maateaduste instituut. https://figshare.com/articles/book/UURINGU_L_PPARUANNE/14420309
- van Aarle, I.M. and Olsson, P.A., 2003. Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6762-6767.
- van der Heijden, M.G., Martin, F.M., Selosse, M.A. and Sanders, I.R., 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New phytologist*, 205(4), pp.1406-1423.

- Vasar, M., Andreson, R., Davison, J., Jairus, T., Moora, M., Remm, M., Young, J.P.W., Zobel, M. and Öpik, M., 2017. Increased sequencing depth does not increase captured diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 27(8), pp.761-773.
- Watson, J.D. and Crick, F.H., 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), pp.737-738.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, eds. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. 18. San Diego, 315–322.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, D.J., Bobbie, R.J. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia* 40:51–62
- Wipulasena, A.P. 2021. Development of a high-throughput method for soil fatty acid derivatization and analysis. Magistritöö. Tartu Ülikool, Loodus- ja täppisteaduste valdkond. <http://hdl.handle.net/10062/74374>
- Wu, H., Cai, A., Xing, T., Huai, S., Zhu, P., Xu, M. and Lu, C., 2021. Fertilization enhances mineralization of soil carbon and nitrogen pools by regulating the bacterial community and biomass. *Journal of Soils and Sediments*, 21(4), pp.1633-1643.
- Xu, L., Paterson, A.D., Turpin, W. and Xu, W., 2015. Assessment and selection of competing models for zero-inflated microbiome data. *PloS one*, 10(7), p.e0129606.