

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Mükoloogia õppetool

Helery Harend

ÖKOLOOGILISED VÕRGUSTIKUD MULLASEENTE KOOSLUSTES

Magistritöö

Juhendajad: Leho Tedersoo, PhD

Mohammad Bahram, PhD

Tartu 2015

SISUKORD

1. SISSEJUHATUS	3
2. PROOVIDE KOGUMINE	7
3. MOLEKULAARSED ANALÜÜSID	8
4. BIOINFORMAATIKA	10
5. STATISTILISED ANALÜÜSID	12
6. TULEMUSED	14
6.1 Üldine elurikkus	14
6.2 Statistiliste analüüside tulemused proovialade kaupa	15
6.3 Võrgustiku analüüsi tulemused	17
7. ARUTELU	21
8. TABELID JA JOONISED	24
9. KOKKUVÕTE	53
10. KASUTATUD KIRJANDUS	54
Summary	61

1. SISSEJUHATUS

Mõeldes sõnale süsteem, kerkib minule kui loodusteadustest tugevasti mõjutatud inimesele silme ette üks suvine niidukooslus. Ööviulite ning käokübarate vahel lendlevad pääsusabad, puhub soe tuul, päikesekiired sillerdavad eemal asuval jõeveel, metsmaasikate mõrumagus maitse suus toob silme ette mälestused vanaisaga metsas käikudest, pea kohal tiirutab ärev hiireviu, kelle sihtmärk - jutttselg-hiir - siblib meeldivalt lõhnavate kõrreliste vahel. Selles süsteemis on lugematul hulgal osi, mis kõik on omavahel vähemal või rohkemal määral seotud ning üksteisest sõltuvad. Selliste süsteemide, kuid näiteks ka lennuplaanide või sotsiaalvõrgustike uurimiseks rakendatakse võrgustiku analüüsi meetodit. See kompleksne mitmetasandiline tööriist võimaldab ühes süsteemis paiknevad osad liita visuaalselt nähtavaks võrgustikuks ning kirjeldada võrgustike erinevaid omadusi.

Igale süsteemile on iseloomulik kindel struktuur ning omadused. Just need peavad tagama süsteemi funktsioneerimise. Võrgustiku struktuuri mõistmine sünökoloogilisest vaatevinklist on oluline, kuna struktuur mõjutab väga tugevasti koosluse funktsioneerimist ja suksessiooni (Strogatz 2001). Liikidevahelised interaktsioonid võivad keerukate ökosüsteemide püsimises ning toimimises mängida olulisemat rolli kui liigirikkus ning liikide ohtrus (Montoya *et al.* 2006). Koosluses esinevad liikidevahelised suhted võivad olla nii positiivsed, negatiivsed kui ka neutraalsed. Millist ning kui tugevat mõju konkreetne interaktsioonimuster ökosüsteemile avaldab? Millised liigid omavahel interakteeruvad? Mis mõjutab interaktsioonimustri teket? Missugune interaktsioonitüüp on koosluses domineeriv? Need on küsimused, millele aitab vastust leida võrgustiku analüüsi meetod.

Ökosüsteemide üks lahutamatu, kuid üksjagu raskesti uuritav komponent on muld ning sealne väga mitmekesine mikroelustik. Seentel on mullas palju erinevaid ülesandeid. Nad osalevad süsinikuringes, varustavad sümbiontidena taimi mineraalainetega, kaitsevad taimi patogeensete organismide eest jne. Nende seenekoosluste uurimine on siiani olnud raskesti teostatav ning seega teatakse nendest vähe. Interaktsioonide uurimise ning olulisuse hindamise kõige tavalisem meetod ökoloogias on eksperimentaalne manipuleerimine, mille

käigus eemaldatakse kooslusest teatavad organismid; mikroobikoosluste puhul ei ole sellise meetodi rakendamine aga teostatav (Kennedy *et al.* 2014). Alternatiivne meetod on kirjeldada liikidevaheliste interaktsioonide mustreid. Jared Diamond uuris Bismarcki saarestiku erinevatel saartel elavaid linnuliike, et mõista, millised protsessid määravad erinevate linnukoosluste stabiilse püsimise saartel, mis üksteisest keskkonna ning suuruse poolest oluliselt ei erine. Töö tulemustes tõi ta välja, et on liikide lubatud kombinatsioonid (ingl *permissible combinations*) - liigid esinevad koos tihemini, kui juhus seda eeldaks - ning mittelubatud kombinatsioonid (ingl *checkerboard distribution*) - teatud liigid ei esine kunagi koos (Diamond 1975).

Toimiva meetodika puudumise tõttu pole liikidevahelisi interaktsioone mullas senini olnud võimalik käsitleda. Tänapäevaks on need meetodid olemas ning pilguheit mullas asetleidvatele interaktsioonidele on seeläbi mõeldav. Molekulaarsete meetodite kiire areng, sh DNA sekveneerimine ja nn meta-triipkoodistamine, võimaldavad määrata mulla mikroobikooslusi kiiresti ning paljudest proovidest (Fierer *et al.* 2007). Sellised võimalused on avanud meie silmad mulla mikroobikoosluste liigirikkuse osas. Sekveneerimisel saadav infohulk on tohutu ning ilma bioinformaatiliste meetoditeta haldamatu. Kasutades erinevaid arvutiprogramme ning programmeerimiskeeli, on sekveneerimisandmetele võimalik anda taksonoomilised määrangud ning neid kasutada edaspidistes analüüsid.

Võrgustike analüüs on matemaatiline lähenemine andmestikele, mille elemendid on omavahel seotud. See on liikidevaheliste interaktsioonide uurimise üks võimalik meetod. Võrgustik on iga süsteem (sotsiaalmeedia, transport, toiduahel), mis koosneb kahest komponendist - sõlmedest (ingl *node*) ning lülidest (ingl *link*). Sõlmede puhul on tegemist võrgustikusiseste üksikelementidega ning lülidest puhul kahte võrgustikuelementi ühendavate võrgustiku osistega (Proulx *et al.* 2005). Ökoloogiline võrgustik (ingl *ecological network*) on biotiliste vastastikmõjude esindatus ökosüsteemis, kus erinevate või samade liikide isendid (sõlmed) on omavahel mitmesuguste positiivsete või negatiivsete suhete (lülidest) kaudu ühenduses (Montoya *et al.* 2006; Deng *et al.* 2012). Uurides ökoloogilistes kooslustes esinevaid liikidevahelisi interaktsioone, käsitletakse peamiselt ühejaolisi (ingl *unipartite network*), kahejaolisi (ingl *bipartite network*) ning kolmejaolisi (ingl *tripartite network*) võrgustikke.

Ühejaoliste võrgustike puhul kuuluvad võrgustiku sõlmed kõik ühte rühma ning interaktsioonid leiavad aset rühmasiseselt; iga sõlm võib olla seotud mistahes teise sõlmega selles võrgustikus (Bascompte ja Jordano 2007). Sellise võrgustiku näiteid on mitmeid: interakteeruvad mikroorganismid inimese suuõõnes (Chen *et al.* 2015); mulla mikroobikooslused (Barberán *et al.* 2012); koos elavad linnuliigid (Diamond 1975). Kahe-, kolme- või enamajaolised võrgustikud kuuluvad mitmejaoliste võrgustike (ingl *multipartite network*) tüüpi. Sellistes võrgustikes jaotub sõlmede arv n hulka ning interaktsioonid leiavad aset hulkade vahel, aga mitte kunagi sama hulga siseselt. Kahejaolises võrgustikus on sõlmed jaotatud kahte selgelt erinevasse rühma (Bascompte ja Jordano 2007) ning kolmejaoliste võrgustike puhul on sõlmetüüpe kolm. Näiteid ökoloogilistest kahejaolisest võrgustikest on samuti palju: taimede ja nende tolmeldajate vahelised mutualistlikud võrgustikud (Toju *et al.* 2014), taim-herbivoor antagonistlikud võrgustikud (Thébault ja Fontaine 2010), orhideed ning nende seensümbiondid (Jacquemyn *et al.* 2011; Martos *et al.* 2012). Kolmejaolisi võrgustikke käsitledes on uuritud rannikukoosluse troofilisi ning mittetroofilisi interaktsioone (Kéfi *et al.* 2015), arbuskulaarmükoriisete (AM) taimede, AM seente ning mükorisosfääris esinevate bakterite vahelist suhetevõrgustikku (Vestergård *et al.* 2008), aga ka taimede, taimekahjurite ning nende parasitoidide vahelist interaktsioonivõrgustikku (Derocles *et al.* 2015). Käesolevas töös on vaatluse all ühejaolised koosinemisvõrgustikud (ingl *co-occurrence network*), mille sõlmedeks on seeneriiki kuuluvad taksonoomilised üksused (ingl *Operational taxonomic unit*; OTU) ning lülideks nendevahelised interaktsioonid.

Mullaseened on enamasti silmale nähtamatud ning nende koosseis ja sealne interaktsioonimuster suuresti tundmata. Mullaseente koosluste uurimine on põnev ning tänu edasiarendustele mitmes valdkonnas tänapäeval võimalik. Selleks, et mõista mullaseente koosluste olulisust koosluste kui tervikute püsimisel, tulebki neid pisikesi äärmiselt olulisi organisme lähemalt uurida. Lisaks sellele võib mullaseente koosluste tundmine aidata kaasa koosluste säilitamisele ning taastamisele. Teades selles esinevate organismide rolle, tähtsust ning organismidevahelisi interaktsioone, saame seda praegustes muutuvates keskkonnatingimustes rakendada ka koosluste kaitses. Liites teadmised erinevate organismirühmade vahel või rühmasiseselt moodustunud võrgustikest, muutub tervikpilt

selgemaks. Pealtnäha täiesti erinevate ja omavahel seost mitteomavate võrgustike uurimine täiendab kogu süsteemi tervikuna (Bascombe 2009).

Selle töö eesmärk on kirjeldada kaheksa erineva ökosüsteemi mulla seenekooslust: leida interakteeruvad seentaksonite paarid, vaadelda positiivsete ning negatiivsete interaktsioonide osakaalu interaktsioonivõrgustikus, leida võrgustike topoloogiat kirjeldavad parameetrid ning neid mõjutavad tegurid. Töö käigus püstitasin järgmised alternatiivsed hüpoteesid: 1) võrgustiku topoloogia on keskkonnast tugevasti sõltuv; 2) esinevad seentaksonid, mille vaheline koosinemine on tuvastatav mitmes vaatluse all olevas seenekoosluses; 3) seenekooslustes esineb positiivseid ja negatiivseid interaktsioone erineval määral.

2. PROOVIDE KOGUMINE

Mullaproovid on kogutud aastatel 2012-2013 kaheksalt alalt: Soomest, Indiast, Iraanist, Jaapanist, Vietnamist, Zimbabwest ning Eestist (tabel 1). Selleks, et vähendada keskkonna heterogeensusest tulenevat efekti valiti proovialadeks homogeenised ning monodominantsed alad. Neil aladel domineeris üks või ühel juhul (Zimbabwe) ka kaks ektomükoriisset taimeliiki. Mullaproovide kogumiseks eemaldati 1-1,5 m kauguselt puutüvest mulda kattev varisekiht ning sambla- ja samblikurinne. 14 mm diameetriga plasttoru (sügavus 15 mm) abil võeti ~2 cm³ suurune mullaproov. Proovid tähistati kollektsiooninumbri ning koordinaatidega ja kuivatati. Igalt alalt koguti 30-meetriste vahedega 53-62 proovi (tabel 2).

Mullaproovide keemiliseks analüüsimiseks kaaluti igast proovist 15-30 mg mulda, mis homogeniseeriti sagedusel 30 Hz, kasutades 3,2 mm diameetriga metallkuule. Tinakapslitesse paigutatud homogeenest mullast määrati mass-spektromeetri (MAT 253, *Thermo Electron*, Bremen, Saksamaa) abil lämmastiku- (N) ning süsinikusisaldus (C), C ja N suhe ning stabiilsete isotoopide $\delta^{13}\text{C}$ ja $\delta^{15}\text{N}$ sisaldused (Tedersoo *et al.* 2014b). Kliimaandmed (aasta keskmine sademete hulk ning aasta keskmine temperatuur) pärinevad WorldClim andmebaasist (www.worldclim.org).

3. MOLEKULAARSED ANALÜÜSID

Seenorganismide DNA eraldamiseks kaaluti kuivatatud proovidest 0,20 g mulda, mis homogeniseeriti 3,2 mm diameetriga teraskuulidega 1,5 ml tuubides 10 minuti jooksul sagedusel 30 Hz. DNA eraldamiseks kasutati kitti *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio, Carlsbad, California, USA) vastavalt tootja protokollile. DNA eraldusele järgnes DNA polümeraasi ahelreaktsioon (ingl *polymerase chain reaction* PCR). Esmalt viidi läbi kontroll-PCR, milles kasutati pärisuunalise praimerina 58SF (5' ATGCATCGATGAAGAACGC 3') ning vastassuunalise praimerina ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Tsükliite arv kontroll-PCR-s oli 25 ning praimerite seondumistemperatuur 55 °C. Sellele järgnenud sekveneerimiseks (nelja paralleelina iga DNA proovi kohta) läbi viidud PCR-s kasutati pärisuunalise praimerina ITS3tagmix (1, 2, 3, 4, 5, 10) ja vastasuunalise praimerina ITS4ngs, et amplifitseerida ITS2 regioon (praimerite järjestused on esitatud tabelis 3). PCR segu nii kontroll- kui ka sekveneerimisamplifitseerimise puhul (20 µl) sisaldas järgmisi komponente: 1 µl DNA, 5 µl 5x *Hot FirePol Blend Mastermix* (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), 10 pmol mõlemat praimerit ning steriilset destilleeritud vett. PCR-s kasutati järgmist programmi: 95 °C juures 15 minuti jooksul toimus termostabiilse DNA polümeraasi aktivatsioon, millele järgnes olenevalt kontroll-PCR-i tulemustest kas 25 (tugev PCR-i produkt), 30 (nõrk PCR-i produkt) või 40 (väga nõrk PCR-i produkt või negatiivne tulemus) tsükliit: 95 °C juures 15 sekundi jooksul DNA kaksikahelalise struktuuri denatureerimine; 55 °C juures 30 sekundi jooksul praimerite seondumine DNA üksikahelatele ning 72 °C juures 1 minuti vältel DNA ahelate süntees. Kõige viimase PCR-etapina toimus ühekordne DNA elongatsioon 10 minuti vältel 72 °C juures. PCR-i käigus sünteesiti ~450 aluspaari (bp) pikkused DNA fragmendid PCR masinas (*Eppendorf Mastercycler Pro*; *Eppendorf AG*, Hamburg, Saksamaa), mille olemasolu ning hulka kontrolliti DNA elektroforeesil. DNA fragmentide lahutamiseks kasutati 1% agarosgeeli etiidumbromiidiga ja 1xTBE (Tris-boraat-EDTA) puhvrit. Seejärel visualiseeriti DNA geelis 280 nm UV-laual ning pildistati. PCR produktide puudumise korral viidi läbi kordus-PCR, suurendades tsükliite arvu viie võrra. Kuna pärast PCR-i on DNA fragmentide kontsentratsioon proovides erinev, järgnes DNA kontsentratsioonide normaliseerimine, milleks kasutati kitti *SequalPrep Normalization Plate* (96) *Kit* (*Invitrogen*, *Life Technologies*,

Carlsbad, California, USA) vastavalt tootja protokollile. Normaliseeritud PCR-produktid kontsentreeriti DNA sadestamisega. Selleks lisati 350 µl-le DNA-le 135 µl 3 M Na-atsetaati, pH 5,2, 2 µl DNA sademe värvimisainet *Pellet Paint* (Novagen, Darmstadt, Saksamaa) ning 962,5 µl 96% külma etanooli (-20 °C). Kõik segati 5 sekundi jooksul ning DNA sadestati üleöö -20 °C juures. Pärast sadestamist tsentrifugeeriti DNA 4 °C juures 20 minuti jooksul 1,5 ml tuubi põhja. Sadet pesti 75%-lise külma etanooliga ja kuivatati toatemperatuuril 3-5 minuti jooksul ning seejärel lahustati 80 µl kõrgdestilleeritud ning autoklaavitud vees. DNA kontsentratsiooni mõõtmisel kasutati kitti *Qubit dsDNA HS Assay Kit*; (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) ning *Qubit 2.0* fluorimeetrit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Viimase etapina viidi läbi DNA sekveneerimine. See teostati Tartu Ülikooli ja Biokeskuse Genoomika tippkeskuses Tartus, kasutades *Illumina TruSeq PCR-free* protokollit ja DNA adaptoreid ning *MiSeq* sekvenaatorit (Illumina, San Diego, California, USA). (Tedersoo *et al.* 2015)

4. BIOINFORMAATIKA

DNA järjestused filtreeriti kvaliteedi alusel, kasutades programmeerimiskeelt *perl* ning varem välja töötatud skripti (Balint *et al.* 2014; tabel 4). Selle abil eemaldati madala keskmise kvaliteediga (<29) ja ebamääraseid (N) nukleotiide sisaldavad sekvensid. Filtreeritud järjestused seoti programmis *PANDAseq* (Masella *et al.* 2012), määrates minimaalseks ülekatvuseks 25 aluspaari (tabel 4). Lisaks eemaldati ka sekvensid, mis sisaldasid praimerite järjestusi mujal kui 3' ja 5' otsas (Balint *et al.* 2014). Seejärel jaotati DNA järjestused molekulaarsete tunnusjärjestuste alusel proovidesse kasutades programmi *mothur v1.33.3* (Schloss *et al.* 2009). ITS2 regiooniga külgnevad 5.8S ja 28S geenide fragmendid eemaldati programmis *ITSx 1.0.9* (Bengtsson-Palme *et al.* 2013), millele järgnes kimäärade eemaldamine *uchime* algoritmide abil (Edgar *et al.* 2011). Täispikad ITS2 järjestused klasterdati 97% sarnasuse alusel, kasutades programme *usearch* (Edgar 2010) ja *BlastClust* (Altschul *et al.* 1990). Iga klatri jaoks valiti kõige pikem esindusjärjestus, mida võrreldi UNITE (referents; Kõljalg *et al.* 2013) ja INSDC (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*; Nakamura *et al.* 2013) andmebaaside vastu kasutades BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides*) algoritmi (Altschul *et al.* 1990). Kokku saadi 16 173 taksonoomilist üksust.

Tabel 4 DNA järjestuste arv

Prooviala	Algne arv	perl -q 29 -l 150	Panda
India	914 296	730 448	466 730
Iraan	2 079 834	303 635	186 632
Jaapan	496 739	366 080	238 617
Liiva-Putla	1 477 582	1 350 382	1 010 289
Loode-Tammik	735 324	569 044	390 051
Soome	2 680 846	2 249 514	1 628 437
Vietnam	1 443 750	1 320 309	957 196
Zimbabwe	718 746	602 169	386 843
Positiivne kontroll	2 279 964		
Kokku	12 827 081		

Järgnes filtreeritud andmete taksonoomilise info võimalikult täpne määratlemine artikli Tedersoo *et al.* (2014a) põhjal. Selleks võrreldi taksonoomiliste üksuste taksonoomiat päringutega saadud kümne sarnaseima võrdlusjärjestuse taksonoomiaga. Uus manuaalne BLASTn otsing INSD andmebaasi vastu tehti, kui olemasolev taksonoomiline info oli kaheldav. Sekventside seeneriiki määramiseks loeti BLASTn otsingu tulemus usaldusväärseks, kui e-väärtus oli $< e^{-50}$. Suuremate e-väärtuste korral määratleti OTU rühma „*mittemääratud*”. OTUde määramisel perekonna, sugukonna, seltsi või klassi tasemeni kasutati päringute tulemusel saadud sarnasusprotsenti ning e-väärtust. Sarnasuse aluseks võeti vastavalt 90,0%; 85,0%; 80,0%; 75,0%. Järgnevalt määrati nende taksonoomiliste üksuste, mille taksonoomiline info oli perekonnatasemeni teada, ökoloogilised rühmad. Ülejäänud OTUd määrati rühma „*teadmata*”, mis tähistab kategooriat ökoloogiline rühma teadmata. Eraldi määrati sümbiotroofide mükoriisatüüp. Kasutades Tedersoo ja Smith (2013) tööd, määrati OTU ektomükoriisiks, kui andmete võrlduses ilmnes sarnasus ektomükoriiseliiniga. Kõik krohmseened (*Glomeromycota*) määrati arbuskulaarmükoriisseteks. Seejärel eemaldati statistiliste meetoditega artefaktist *TAG switching* (cf. Carlsen *et al.* 2012) tulenevad ning positiivsete ja negatiivsete kontrollide abil proovide saastusest tulenevad vigased andmed. Bioinformaatilise etapi käigus eemaldati kokku 9904 sekvensi, mis esines üle kõigi proovide ainult ühes korduses (ingl *singleton*). Lõplik OTUde arv pärast andmete korrigeerimist oli 14 784 taksonoomilist üksust 467 proovi kohta ning andmematriks sisaldas 243 827 sekvensi. Selleks, et erinevate proovialade analüüsid eraldi läbi viia, jagati esialgne andmetabel kaheksaks alamtabeliks (tabel 2).

5. STATISTILISED ANALÜÜSID

Kasutades statistikatarkvara R pakette *vegan*, *fields* ja *packfor* (R Core Development Team 2013), arvutati ruumi omavektorid (ingl *spatial eigenvectors*; PCNM). PCNM omavektoreid kasutatakse ruumiandmete transformeerimiseks kujule, mis võimaldavad läbi viia ordineerimist ja regressioonanalüüse. Statistiliselt olulised PCNM vektorid sõeluti välja käsuga *forward.sel* (olulisusnivoo = 0,05). Kui toorandmed on esitatud kahe punkti vaheliste kaugustena, on võimalik Mantel r korrelatsioonikordaja abil koostada korrelogramm. Antud töös arvutati Mantel korrelogrammid, et testida ruumilist autokorrelatsiooni erinevate proovide vahel erinevates kaugusrühmades (ingl *distance class*). Lisaks viidi läbi Mantel test, et leida, kas mullaparaameetrid on ruumiliselt autokorreleeritud. Kasutades R paketti *vegan* viidi läbi *adonis* funktsiooni kasutades multivariaatne dispersioonanalüüs PERMANOVA (ingl *multivariate ANOVA*). Selleks, et hinnata proovidevahelist ruumilise autokorrelatsiooni mõju, kasutati PERMANOVA dispersioonanalüüsis koosluse variatsiooni kirjeldavaid olulisi PCNM vektoreid. Lisaks viidi läbi osaline Mantel test, et hinnata mullaparaameetrite mõju OTUde koosseisule.

Järgmisena viidi arvutuskeskkonnas R läbi lineaarsete mudelite analüüs, et hinnata millised faktorid (aasta keskmine õhutemperatuur, aasta keskmine sademetehulk, N ja C sisaldus, laiuskraad, OTU-rikkus ning sekventsiaalsus proovi kohta) mõjutavad võrgustiku paraameetreid (modulaarsus, klasterdumiskoeffitsient ning keskmine ahela pikkus) taksonoomilise üksuse tasemel.

Üldiste võrgustikuparaameetrite leidmiseks kasutati andmestike analüüsimisel Deng *et al.* (2012) poolt välja töötatud veebipõhist platvormi MENA (<http://ieg2.ou.edu/MENA/login.cgi>). Igale alale seltsi, sugukonna, perekonna ning OTU tasemel leitud võrgustiku paraameetrid on esitatud tabelites 5-8. Kasutades Williams *et al.* (2014) väljatöötatud analüüsimeetodit, viidi läbi koosinemise analüüs. Esmalt leiti igast andmestikust koosinevad sõlmepaarid, millest omakorda sõeluti välja vaid tugevat interaktsiooni omavad paarid (Spearmani $\rho > 0,5$; $p < 0,05$). Spearmani ρ on mitteparaameetriline

korrelatsioonikoeffitsient kahe muutuja vastastikusest sõltuvusest. See kirjeldab, kui hästi on kahe muutuja vaheline suhe kirjeldatav monotoonse funktsiooniga. Kasutades tugevaid interaktsioone omavaid sõlmepaare, visualiseeriti koosinemisvõrgustikud programmis *Gephi* (Bastian *et al.* 2009). Võrgustiku loomisel kasutati suunamata võrgustiku (ingl *undirected graph*) funktsiooni ning *Fruchterman-Reingold* asetust. Lisaks arvutati igale alale C-skoor (ingl *C-score*) väärtused, mis on liigipaaridevahelist koosinemist iseloomustav statistik (Stone ja Roberts 1990). Selleks kasutati R pakette *vegan* ning *bipartite*.

Panus töösse:

Idee ja disain: Harend H., Tedersoo L., Bahram M.; välitööd: Harend H., Tedersoo L., Bahram M., Kohout P.; molekulaarsed analüüsid: Harend H., Liiv I., Puusepp R.; bioinformaatiline analüüs: Harend H., Anslan S.; järjestuste analüüs: Harend H.; statistiline analüüs: Harend H., Bahram M.; kirjutamine: Harend H.

6. TULEMUSED

6.1 Üldine elurikkus

467 proovist saadi kokku 243 827 sekventsi, mis jaotati 14 784 taksonoomiliseks üksuseks. Keskmine OTUde arv proovis oli 122 (standardhälve SD = 53,9; miinimumväärtus 47; suurim väärtus 327; mediaan 114) ning keskmine sekventside arv proovis 424 (standardhälve SD = 249; miinimumväärtus 53; suurim väärtus 1583; mediaan 384). Arvestades ühe mullaproovi suurust (~2 cm³), on OTUde arv oodatav. Kõikide proovialade peale kokku oli võimalik määrata perekonna tasemeni 3969 taksonoomilist üksust 14 784-st ning neile omistati ka kuuluvused ökoloogilistesse rühmadesse. 271 taksonoomilist üksust määrati biotroofideks, (mille hulka kuulusid taimepatogeenid (214) ning loomade (25) ja seente (32) parsiidid), 43 flagellaatideks, 2096 saprotroofideks ning 1559 sümbiotroofideks (EcM (1440), AM (54), samblikke moodustavad seened (64), looma seedekulglä sümbiont (1)). Saprotroofide, biotroofide ning sümbiotroofide jaotumist erinevatel proovialadel iseloomustavad joonised 1-8 protsentides. Biotroofide osakaal kõikidel proovialadel oli kõige väiksem (1-16%). Saprotroofide enamus esines Vietnami (67%) prooviala puhul kõige tugevamini, sellele järgnesid Zimbabwe (64%), Soome ja Jaapan (mõlemal alal 58%), Loode-Tammik (53%) ning Iraan (49%). India ning Liiva-Putla proovialadel olid domineerivaks aga sümbiotroofid (vastavalt 54% ja 56%). Taksonoomiliste üksuste üldine jaotus hõimkondadesse on välja toodud joonistel 9-16. Hõimkondade jaotumist kujutatavatel joonistel on OTUde koguarv vastavalt proovialadele on ära toodud tabelis 2. Hõimkondade jaotumist iseloomustavatel diagrammidelt on näha, et India, Iraani, Liiva-Putla, Loode-Tammiku ja Zimbabwe proovialadel oli esindatud viis hõimkonda (*Ascomycota*; *Basidiomycota*; *Chytridiomycota*; *Glomeromycota*; *Zygomycota*), Soome proovialal kuus (lisaks eelnevatele veel *Blastocladiomycota*) ning Jaapani ja Vietnami proovialade seitse (lisaks eelnevatele veel *Rozellomycota*). India, Iraani, Jaapani, Liiva-Putla ja Loode-Tammiku proovialade puhul on domineerivaks hõimkonnaks *Basidiomycota* (39-54%), kuid Soome, Vietnami ja Zimbabwe proovialadel *Ascomycota* (35-45%). Kõige rohkem taksonoomilisi üksusi jäi hõimkonna

tasemeni määramata (*unclassified_fungi*) Soome prooviala puhul (31%), teiste alade puhul 16-24% prooviala taksonoomilistest üksustest.

6.2 Statistiliste analüüside tulemused proovialade kaupa

Autokorrelatsiooni analüüsid ei tuvastatud India andmestikus proovide ruumilise kauguse efekti. Analüüsid mullaparameetrite mõju OTUde kompositsioonile maatriksi kujul, leiti statistiliselt toetatud nõrk efekt ($R_{\text{Mantel}} = 0,144$; $P = 0,049$). Võttes osalise Mantel testiga arvesse nii OTUde kompositsiooni, ruumimõju kui ka mullaparameetrite mõju, siis mingit mullaparameetrite efekti ei leitud ($R_{\text{Mantel}} = 0,005$; $P = 0,445$). Sellest tulenevalt võib väita, et ruumiline autokorrelatsioon India andmestikus tuleneb ruumist, mitte ruumiliselt mõjutatud mullaparameetritest ($R_{\text{Mantel}} = 0,144$; $P = 0,049$). PERMANOVA tulemusel leiti, et kooslust mõjutavad minimaalselt mulla lämmastiku ($R^2 = 0,023$; $N = 57$; $F_{1,51} = 1,33$; $P = 0,002$), süsiniku ($R^2 = 0,22$; $N = 57$; $F_{1,51} = 1,23$; $P = 0,018$) ja $\delta^{15}\text{N}$ sisaldus ($R^2 = 0,023$; $F_{1,51} = 1,29$; $N = 57$; $P = 0,007$). Samuti leiti, et proovide ruumiline paigutus seletab prooviala OTUde mitmekesisust ($F_{1,55} = 14$; $R^2 = 0,203$; $P < 0,001$).

Iraani andmestiku puhul viidi esmalt läbi ruumilise autokorrelatsiooni hindamiseks Mantel test. Selle tulemusel leiti, et proovide ruumilise kauguse efekt OTUde kompositsiooni mõjutajana oli oluline, kuid väga nõrk ($R_{\text{Mantel}} = 0,085$; $P = 0,024$). Lisaks leiti teise Mantel testi ($R_{\text{Mantel}} = 0,006$; $P = 0,433$) ning osalise Mantel testi tulemusel ($R_{\text{Mantel}} = 0,085$; $P = 0,039$), et mullaparameetrid ei määra autokorrelatsiooni ning Iraani andmestiku puhul tuleneb see ruumist. PERMANOVA tulemusel leiti, et statistiliselt oluliselt mõjutavad kooslust süsiniku ($R^2 = 0,024$; $N = 63$; $F_{1,57} = 1,51$; $P = 0,001$) ja lämmastiku sisaldus mullas ($R^2 = 0,024$; $N = 63$; $F_{1,57} = 1,51$; $P = 0,001$).

Analüüsid ruumilist autokorrelatsiooni Jaapani andmestikus leiti, et prooviala OTUde kompositsiooni mõjutavad nõrgalt nii proovide ruumilise kauguse efekt ($R_{\text{Mantel}} = 0,132$; $P = 0,001$) kui ka mullaparameetrid ($R_{\text{Mantel}} = 0,167$; $P = 0,015$). Viies läbi PERMANOVA leiti, et kooslust mõjutavad lämmastiku ($R^2 = 0,027$; $N = 54$; $F_{1,48} = 1,45$; $P < 0,001$), süsiniku ($R^2 =$

0,023; N = 54; $F_{1,48} = 1,27$; $P = 0,002$) ja $\delta^{13}\text{C}$ sisaldus mullas ($R^2 = 0,024$; N = 54; $F_{1,48} = 1,32$; $P = 0,002$).

Mantel testide tulemusel leiti, et Liiva-Putla andmestikus olid koosluse OTUde kompositsiooni mõjutajateks mullaparaameetrid ($R_{\text{Mantel}} = 0,206$; $P > 0,001$). Järgmiseks läbi viidud PERMANOVA tulemusena leiti, et kooslust mõjutavad lämmastiku ($R^2 = 0,034$; N = 61 ; $F_{1,55} = 2,133$; $P < 0,001$), süsiniku ($R^2 = 0,02$; N = 61 ; $F_{1,55} = 1,26$; $P = 0,031$) ja $\delta^{15}\text{N}$ sisaldus ($R^2 = 0,025$; N = 61 ; $F_{1,55} = 2,133$; $P = 0,006$) ning C ja N suhe ($R^2 = 0,024$; N = 61 ; $F_{1,55} =$; $P = 0,009$). Samuti leiti, et $\delta^{15}\text{N}$ sisaldus mullas ($F_{1,59} = 14,7$; $R^2 = 0,2$; $P < 0,001$) ning proovide ruumiline paigutus ($F_{1,59} = 4,47$; $R^2 = 0,0704$; $P < 0,001$) seletavad Liiva-Putla prooviala OTUde mitmekesisust.

Autokorrelatsioonitesti tulemusel leiti, et Loode-Tammiku andmestiku proovide ruumilise kauguse efekt OTUde kompositsioonile on oluline ($R_{\text{Mantel}} = 0,239$; $P > 0,001$) ning mullaparaameetrite mõju puudub ($R_{\text{Mantel}} = 0,133$; $P = 0,055$). PERMANOVA tulemusel leiti, et lämmastiku ($R^2 = 0,024$; N = 60; $F_{1,50} = 1,342$; $P = 0,005$), $\delta^{15}\text{N}$ - ($R^2 = 0,025$; N = 60; $F_{1,50} = 1,311$; $P < 0,001$), $\delta^{13}\text{C}$ -sisaldus ($R^2 = 0,026$; N = 60; $F_{1,50} = 1,452$; $P < 0,001$) ning C ja N suhe mullas ($R^2 = 0,023$; N = 60; $F_{1,50} = 1,311$; $P = 0,009$) mõjutavad prooviala OTUde kompositsiooni.

Mantel testi abil leiti, et mullaparaameetrid mängivad Skandinaavia andmestiku ruumilises autokorrelatsioonis olulist, kuid nõrka rolli ($R_{\text{Mantel}} = 0,252$; $P = 0,007$). OTUde kompositsiooni mõjutavad lämmastiku ($R^2 = 0,022$; N = 61; $F_{1,55} = 1,36$; $P = 0,012$) ning süsiniku sisaldus ($R^2 = 0,037$; N = 61; $F_{1,55} = 2,33$; $P < 0,001$) mullas.

Vietnami andmestikuga läbi viidud Mantel testi abil leiti, et mullaparaameetrite ruumilise autokorrelatsiooni efekt on oluline, kuid nõrk ($R_{\text{Mantel}} = 0,186$; $P = 0,015$). OTUde kompositsiooni mõjutavad lämmastiku ($R^2 = 0,022$; N = 55; $F_{1,49} = 1,237$; $P = 0,005$), süsiniku ($R^2 = 0,027$; N = 55; $F_{1,49} = 1,47$; $P < 0,001$) ning $\delta^{13}\text{C}$ sisaldus ($R^2 = 0,023$; N = 55; $F_{1,49} = 1,261$; $P = 0,002$) mullas.

Zimbabwe andmestikus ruumilise autokorrelatsiooni mõjutajaid Mantel testi abil ei tuvastatud (proovide ja ruumikoordinaatide vaheline seos $R_{\text{Mantel}} = 0,013$; $P = 0,394$; osalise Mantel testi tulemus $R_{\text{Mantel}} = 0,011$; $P = 0,393$; mullaparameetrite ja ruumikoordinaatide vaheline seos $R_{\text{Mantel}} = 0,0924$; $P = 0,133$). PERMANOVA tulemusel leiti, et koosluse OTUde kompositsiooni mõjutavad lämmastiku sisaldus ($R^2 = 0,022$; $N = 60$; $F_{1,54} = 1,337$; $P = 0,008$) ning C ja N suhe ($R^2 = 0,022$; $N = 60$; $F_{1,54} = 1,293$; $P = 0,019$) mullas.

Kõikide alade puhul viidi läbi ka Mantel test, et teha kindlaks, kas mullad on ruumis autokorreleeritud. Ühegi prooviaala puhul olulist seost ei tuvastatud.

Lineaarsete mudelite analüüs taksonoomilise üksuse tasemel ühtegi tugevat võrgustiku parameetrite mõjutajat ei tuvastanud. Ainus leitud statistiliselt oluline tulemus ($F_{1,6} = 6,619$; $R^2_{\text{adjusted}} = 0,4453$; $P = 0,042$) saadi sademetehulga ning klasterdumiskoeffitsiendi vahel. Seda tulemust antud töös siiski usaldusväärseks ei loeta, kuna ühe prooviaala (India) sademetehulk erines teistest tunduvalt ning samuti on saadud p-väärtus vaid vaevu oluline. Vahepealsete sademehulkadega prooviaalade puudumise tõttu ei ole võimalik selle tulemuse põhjal midagi kindlat väita.

6.3 Võrgustiku analüüsi tulemused

Andmestikes oli sekventside arv proovides väga varieeruv ning seetõttu teisendati sekventside rohkus normaliseeritud väärtuseks. Iga ala puhul kaasati analüüsi vaid need taksonoomilised üksused, mis esinesid vähemalt viies või enam korduses üle proovide. See eemaldab andmestikust haruldased OTUd ning vähendab võrgustiku kompleksust, mis aitab kaasa koosluse interaktsioonituumiku tuvastamisele (Barberán *et al.* 2012). Igale alale seltsi, sugukonna, perekonna ning OTU tasemele leitud üldised võrgustiku parameetrid on esitatud tabelites 5-8. Antud parameetrid on leitud selleks, et anda ülevaade vaatluse all olevate seenekoosluste võrgustikest tervikuna.

Modulaarsus (ingl *modularity*) on süsteemi mõõde, mis näitab ühes süsteemis paiknevate elementide jaotumist mooduliteks ehk klastriteks ehk kompartmentideks, ning nende moodulite erinevust üksteisest ning võrgustiku killustatuse astet (Jordano 1987; Dupont ja Olesen 2009). Modulaarsus varieerub vahemikus -1-1. Kõrge modulaarsusega võrgustikes on ühe mooduli sõlmed omavahel väga tugevasti seotud, kuid erinevate moodulite sõlmedevaheline seotus on võrdlemisi madal. Modulaarsuse leidmiseks kasutati Deng *et al.* (2012) soovitatud *greedy modularity optimisation* (Newman 2006) valikut. Antud töös käsitletud võrgustikke analüüsides tugevat modulaarsust ei tuvastatud. Kõigi kaheksa prooviala erinevatel taksonoomilistel tasemetel koostatud võrgustike modulaarsus varieerus vahemikus 0-0,116. Samad tulemused saadi ka paralleelselt läbiviidud juhuslikke võrgustikke (null maatriksid; Maslov ja Sneppen 2002) analüüsides. Seega võib järeldada, et vaatluse all olevate võrgustike modulaarsuse väärtused viitavad võrgustike juhuslikule struktuurile. Tuvastatud madal modulaarsus võib olla seotud tugevate (Spearmani $q > 0,5$) interaktsioonide vähesusega võrgustikes. Võrgustikes esineva madala modulaarsuse fundamentaalseks põhjuseks on modulaarse struktuuri väiksem optimaalsus võrreldes mittemodulaarsega (Kashtan ja Alon 2005). Tavaliselt esineb palju selliseid võimalikke lülisid, mis alandavad modulaarsust, kuid suurendavad kohasust (ingl *fitness*).

Klasterdumiskoeffitsient (ingl *clustering coefficient*) on mõõde, mis näitab, kui tugevalt on võrgustik väikese osa piires seotud (Proulx *et al.* 2005), kirjeldades seda, kui hea on naabersõlmede vaheline seotus (Deng *et al.* 2012). Statistika varieerub vahemikus 0-1. Antud töös vaadeldud võrgustike puhul varieerus parameetri väärtus vahemikus 0,291-0,876. Nagu modulaarsuse puhulgi, ilmnis tugev kattumine genereeritud juhuslike võrgustike klasterdumiskoeffitsiendi väärtustega. See kinnitab taaskord võrgustikustruktuuri juhuslikkust vaadeldud kooslustes.

Geodeetiline kaugus on kahte sõlme ühendav kõige lühem ahel (Bouttier *et al.* 2003). Keskmistades selle tulemuse üle kõikide sõlmede võrgustikus, saame keskmise geodeetilise kauguse ehk keskmise ahela pikkuse (ingl *average path distance*), mis iseloomustab kogu võrgustikku tervikuna. Mida väiksem on arvuline väärtus, seda lähemal sõlmed võrgustikus üksteisele paiknevad. Selle abil on võimalik tuvastada võrgustiku kui väikese maailma

omadusi. Kuna vaadeldud võrgustike keskmised ahela pikkused langevad kokku juhuslike võrgustike tulemustega, siis tugevaid järeldusi saadud tulemustest teha ei saa.

Kahe liigi i ja j C-skoor on CS_{ij} , mis on defineeritud kui $CS_{ij} = (R_i - S_{ij})(R_j - S_{ij})$, kus R_i on liigi i rea summa ning R_j liigi j rea summa maatriksis ja S_{ij} tähistab alasid, kus esinevad mõlemad liigid korraga (Stone ja Roberts 1990). C-skoor väärtused arvutatakse kõikidele unikaalsetele liigipaaridele koosluses, millest seejäral leitakse keskmine väärtus, mis iseloomustab koosinemist koosluses. Mida suurem on C-skoor väärtus, seda väiksem osa on juhuslikkusel ning esineb suurem tõenäosus, et ühe liigi jaotumine koosluses on otseselt mõjutatud teise liigi esinemisest või puudumisest koosluses (Gotelli ja Entsminger 2000). Näiteks on konkurentsete suhete korral C-skoor väärtus suurem, kui juhuslike interaktsioonide puhul. Leitud C-skoor väärtused on esitatud tabelis 9. Saadud tulemused on vaid kolmel juhul kaheksast statistiliselt olulised (Liiva-Putla, Loode-Tammik, Soome), kuid C-skoor statistiku madalad väärtused kinnitavad koosluste juhuslikku struktuuri.

Võrgustikus korreleeruvate seenorganismide arvu varieeruvus ning tugevate interaktsioonide arvu varieeruvus on nähtavad tabelis 10. Visualiseeritud võrgustikud OTU tasemel on välja toodud joonistel 17-32. Teistel tasemetel (sugukond ning perekond) graafe ei visualiseeritud, kuna võrgustikus olevate lülide arv oli selleks liiga väike. Selleks, et graafide abil selgemini informatsiooni edastada, lisati sõlmi tähistavatele taksonoomilistele üksustele vastavalt sugukondade (*familia*) ning perekondade (*genus*) nimed (joonised 17-32). Paarituurvulistel joonistel on sõlmedeks *familia*_OTU ja ning paarisarvulistel *genus*_OTU esindajad. Sõlme suurus graafidel näitab sõlme lülide arvu ehk sõlme astet (ingl *normalised node degree*). Sõlme aste väljendab üksiku sõlme lülide arvu teiste sõlmedega (Bascompte 2007). Lülideks on tugevad (Spearmani $q > 0,5$) ning olulised ($P < 0,05$) interaktsioonid. Sõlmed on värvitud taksonoomilise kuuluvuse järgi. Üks töös püstitatud eesmärk oli vaadelda võrgustikus olevate positiivsete ja negatiivsete interaktsioonide osakaalu võrgustikus. Võttes arvesse vaid tugevad (Spearmani $q > 0,5$) ning olulised ($P < 0,05$) interaktsioonid, jäid *familia*_OTU ning *genus*_OTU võrgustikesse alles vaid positiivsed suhted.

Läbi viidi ka erinevate proovialade interaktsioonide võrdlus, et tuvastada kas erinevatel proovialadel esineb interaktsioone, mis leiavad aset samade sõlmepaaride vahel. Selleks võrreldi tugevaid (Spearmani $\rho > 0,5$) ning olulisi ($P < 0,05$) interaktsioone, mille sõlmede taksonoomia oli teada kas sugukonna või perekonnani. Leiti järgmised korduvad interaktsioonid: 1) sugukondadesse *Russulaceae* ja *Thelephoraceae* kuuluvate OTUde vaheline interaktsioon esines nii Liiva-Putlas, Loode-Tammikus, Vietnamis kui ka Iraanis; 2) sugukondadesse *Marasmiaceae* ja *Russulaceae* kuuluvate OTUde vaheline interaktsioon Loode-Tammikus ja Jaapanis; 3) sugukondadesse *Sebacinaceae* ja *Thelephoraceae* kuuluvate OTUde vaheline interaktsioon Loode-Tammikus ja Iraanis; ning 4) ühte sugukonda kuuluvate taksonoomiliste üksuste vaheline interaktsioon sugukonnas *Herpotrichiellaceae* esines Vietnamis ja Zimbabwes.

7. ARUTELU

Selles töös olid vaatluse all kaheksa erineva prooviala mullaseente kooslused. Proovialad hõlmavad globaalset keskkonnagradiendi, ulatudes arktilisest tundrast troopiliste aladeni. Selleks, et vähendada keskkonnast tulenevaid muid mõjutusi, valiti proovialadeks homogeenised taimekooslused. Eesmärk oli kirjeldada seente ökoloogiliste võrgustike struktuuri ning anda ülevaade erinevatest võrgustikku iseloomustavatest parameetritest. Võrgustiku parameetrid aitavad mõista mullaseente vahelisi interaktsioone (Kennedy *et al.* 2014; Barberán *et al.* 2012) ning määrata liikide ökoloogilist tähtsust võrgustikus, võimaldades tuvastada tõenäolisi päiskiviliike (Lupatini *et al.* 2014).

Selline lähenemine püüab tuua selgust küsimusele, kas kooslused koosnevad mittejuhuslikest liikidevahelistest interaktsioonidest (Clements 1916) või on liigid, mis lihtsalt suudavad taluda samu keskkonnatingimusi, koosluses paigutunud juhuslikult (Gleason 1926). Klassikalise kooslusteooria kohaselt on liikide koosesinemine mittejuhuslik (Gotelli ja Graves, 1996). Antud töö tulemused näitavad, et homogeenises keskkonnas esinevad mullaseente võrgustikud omavad juhuslikku struktuuri ning tugev koosesinemine on võimalik tuvastada vaid väga väheste seentaksonite puhul. Mustrite puudumine homogeenises keskkonnas võib tuleneda seente jaotumisest mullas - tingimused on kogu koosluse ulatuses ühtmoodi sobivad ning tugevat positiivset või negatiivset mõju ei oma ka ükski kaaslev OTU. Koide *et al.* (2005) uurisid homogeenises *Pinus resinosa* istanduses ektomükoriisat (EcM) moodustavate seente kooslusi ning seda, kuidas vaadeldud koosluste struktuuri kujundavad liikidevahelised interaktsioonid. Nende töö tulemused näitavad, et EcM seente vahel esineb oluliselt väiksem kooseksisteerimine, kui juhus eeldab (suured C-skoor väärtused). Nad tõid välja, et selle põhjuseks võib olla tugev dominantide negatiivne mõju (negatiivsed Spermani q väärtused), mis võimendab kooseksisteerivate seente vältimisstrateegiat. Homogeenises *Pinus sylvestris* istanduses läbi viidud uurimuse käigus tuvastasid Pickles *et al.* (2012) samuti, et EcM seenekooslusi struktureerivad seeneliikide vahelised konkurentsisuhted. Käesolevas töös selliseid tulemusi aga ei leitud. Küll aga tuvastasid Kennedy *et al.* (2014) homogeenisel *Alnus rubra* alal, et lepagaga seotud EcM seente vahel puuduvad konkurentsed suhted; tuvastatud

seenekoosluse struktuur ei erine juhuslikest assotsiatsioonidest ning koosluses esinevad vaid positiivsed interaktsioonid. Ovaskainen *et al.* (2010) väidavad aga hoopis, et statistiliselt oluline koosinemine võib tuleneda paljudest asjaoludest ning tuvastatud taksonitevahelisi positiivseid või negatiivseid interaktsioone ei tohiks võtta kui kindlaid tõendeid otsestest interaktsioonidest, vaid kui andmestikust tulenevaid uusi hüpoteese.

Teisalt võib oluliselt saadud tulemusi mõjutada geograafiline skaala ja proovide arv. Antud töös analüüsideks kasutatud andmematriksid olid proovide arvu poolest keskmised ning taksonoomiliste üksuste arvu poolest suured. Tuvastatud juhuslikkus võib olla seletatav statistika võimsusega - liiga suure matriksi puhul on tõenäosus oluline seos leida väike. Seega on võimalus, et vähendades olemasoleva andmestiku mahtu, ilmnevad praegu leidmata jäänud seosed. Teisest küljest vaadatuna võimaldab suurem matriks aga tuvastada haruldasemate liikide vahel esinevaid interaktsioone ning seoseid. Väikeste matriksite korral võivad leitavad seosed olla pigem juhuslikud: nii tüüp I kui ka tüüp II vea esinemise tõenäosus on suurem. Koide *et al.* (2005) läbi viidud uurimuses tuvastati EcM seente vahel konkurentsed suhted. Selles uurimuses olid vaatluse all väikesed matriksid. Samad tulemused saadi ka suuremate matriksite puhul (Pickles *et al.* 2012). Kennedy *et al.* (2014) poolt leitud juhuslik EcM seenekoosluse struktuur tuvastati väikeseid matrikseid uurides. Sarnased tulemused leiti ka käesolevas töös, kus vaatluse olid aga suured matriksid. Seega milline skaala seentevaheliste interaktsioonide uurimiseks mullas on õige ning kust läheb piir, tuleb välja selgitada edasiste uuringute käigus.

Lisaks võib leitud juhuslikkust tõlgendada kui kasutatud meetodika nõrku külgi. Antud proovivõtuskem võis kirjeldada kooslusest liiga väikese osa, hõlmates vaid vähesel määral funktsiooni omavaid organisme. Kuna mullas esineb palju spore ning parasjagu funktsiooni mitteomavaid seeni, siis saadud juhuslik struktuur võib kirjeldada just seda osa seenekooslusest. Võimalik lahendus oleks RNA analüüs, mille puhul kaasatakse analüüsi vaid füsioloogiliselt aktiivne osa kooslusest (Rajala *et al.* 2011; Baldrian *et al.* 2012).

Lineaarse mudeli analüüsi käigus ei tuvastatud ühtegi võrgustiku parameetreid mõjutavat faktorit. Arvesse võetud faktorid olid aasta keskmine sademete hulk, aasta keskmine

õhutemperatuur, mulla N- ja C-sisaldus, laiuskraad, OTU-rikkus ning sekventsiooni ohtrus proovi kohta. Mõju võivad omada aga teised faktorid, mille väärtusi antud töös ei mõõdetud (mulla pH, mullaniiskus, juurte tihedus koosluses jne).

Antud töös leiti, et erinevatel aladel mõjutavad OTUde koosseisu mullas erinevad parameetrid. Vaatluse all olnud parameetrites (N, C, C/N, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) osutusid üle proovialade kokkuvõttes oluliseks kõik (iga parameeter vähemalt ühel proovialal). Need tulemused kinnitavad ka varem tuvastatud seoseid. On leitud, et seenekooslusi mõjutab C/N suhe mullas (Burke *et al.* 2009; Coince *et al.* 2013; Wubet *et al.* 2012), N-sisaldus (Paungfoo-Lonhienne *et al.* 2015) ja C-sisaldus (Wubet *et al.* 2012).

8. TABELID JA JOONISED

Tabel 1 Proovialade kirjeldus

Riik	Kohanimi	Ala kirjeldus	Domineeriv taimeliik	Laiuskraad	Pikkuskraad	Kõrgus merepinnast
Eesti	Liiva-Putla	Parasvööteline kliima, okasmets	<i>Pinus sylvestris</i>	58,389	22,655	27 meetrit
Eesti	Loodo-Tammik	Parasvööteline kliima, lehtmets	<i>Quercus robur</i>	58,236	22,441	0,5 meetrit
India	Hebri	Troopiline kliima, madalmaa vihmamets	<i>Vateria indica</i>	13,453	75,021	75 meetrit
Iraan	Sangdeh	Parasvööteline kliima, mägi-lehtmets	<i>Fagus orientalis</i>	36,067	53,167	1571 meetrit
Jaapan	Mt. Tsukuba	Lähistroopiline kliima, lehtmets	<i>Quercus serrata</i>	36,238	140,100	427 meetrit
Soome	Jehkase mäe jalam	Arktiline tundra	<i>Betula nana</i>	69,089	20,769	566 meetrit
Vietnam	Hoang Lien	Troopiline kliima, mägi-vihmamets	<i>Lithocarpus sp.</i>	22,331	103,781	2221 meetrit
Zimbabwe	teadmata	Poolaridne kliima, savann, miombo mets	<i>Julbernardia bohemii</i> ; <i>Brachystegia sp.</i>	-20,018	29,479	1308 meetrit

Tabel 2 OTUde ja proovide arv

Prooviala	OTUd-e arv	Keskmine OTUd-e arv proovi kohta	Miimum OTUd-e arv proovi kohta	Maksimaalne OTUd-e arv proovi kohta	SD	Proovide arv
India	2391	143	46	250	50,8	57
Iraan	2292	116	44	235	35,3	63
Jaapan	2021	98	43	247	40,4	54
Liiva-Putla	1407	85	21	154	30,6	61
Loode-Tammik	1955	100	34	181	33,4	56
Soome	2740	150	21	233	43,8	61
Vietnam	3573	194	114	327	52,1	55
Zimbabwe	1622	95	23	226	44,7	60

Tabel 3 Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Järjestus 5'-3'	Viide
5.8SF	ATGCATCGATGAAGAACGC	Martin ja Rygiwicz 2005
ITS3 mix tag 1	CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCA	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS3 mix tag 2	CTAGACTCGTCAACGATGAAGAACGCA	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS3 mix tag 3	CTAGACTCGTCACCGATGAAGAACGCA	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS3 mix tag 4	CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGTA	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS3 mix tag 5	CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGTGG	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS3 mix tag 10	CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCT	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> 1990
ITS4ngs_001	ACGAGTGCGTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_002	ACGCTCGACATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_003	AGACGCACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_008	ACTCGCGTGTCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_011	ATGATACGTCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_014	ACGAGAGATACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_015	ATACGACGTATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_016	ATCACGTACTATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_017	ACGTCTAGTACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_019	ATGTACTACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a

ITS4ngs_026	ACATACGCGTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_028	ACTACTATGTTCCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_029	ACTGTACAGTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_030	AGACTATACTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_032	AGTACGCTATTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_033	ATAGAGTACTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_034	ACACGCTACGTTCCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_035	ACAGTAGACGTTCCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_036	ACGACGTGACTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_037	ATACACACACTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_038	ATACACGTGATTCCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_039	ATACAGATCGTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_040	ATACGCTGTCTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_041	ATAGTG TAGATTCCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_042	ATCGATCACGTTCCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_043	ATCGCACTAGTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_044	ATCTAGCGACTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_045	ATCTATACTATTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_046	ATGACGTATGTTCCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_047	ATGTGAGTAGTTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_048	AACAGTATATATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_050	ACTAGCAGTATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_052	AGTATACATATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_053	AGTCGAGAGATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_054	AGTGCTACGATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_055	ACGATCGTATATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_056	ACGCAGTACGATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_057	ACGCGTATACATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_058	ACGTACAGTCATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_059	ACGTACTCAGATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_061	ACTATAGCGTATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_062	ATACGTCATCATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_063	ATAGTCGCATATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_065	ATATGCTAGTATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_066	ATCACGCGAGATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_067	ATCGATAGTGATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_068	ATCGCTGCGTATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a

ITS4ngs_069	ATCTGACGTCATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_070	ATGAGTCAGTATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_071	ATGTAGTGTGATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_072	ATGTCACACGATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_073	ATGTCGTCGCATCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_074	ACACATACGCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_075	ACAGTCGTGCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_077	ACGACAGCTCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_078	ACGTCTCATCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_079	ACTCATCTACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_080	ACTCGCGCACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_081	AGAGCGTCACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_082	AGCGACTAGCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_083	AGTAGTGATCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_084	AGTGACACACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_085	AGTGTATGTCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_086	ATAGATAGACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_087	ATATAGTCGCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_088	ATCTACTGACTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a
ITS4ngs_089	ACACGTAGATCTCCTSCGCTTATTGATATGC	Tedersoo <i>et al.</i> 2014a

Tabel 5 Võrgustike parameetrid seltsi tasemel

Võrgustiku parameetrid / prooviaala	India	Iraan	Jaapan	Liiva-Putla	Loode-Tammik	Skandinaavia	Vietnam	Zimbabwe
Sõlmede arv	50	41	47	46	51	59	59	53
Lülide arv	624	583	509	679	607	871	659	629
R²	0,025	0,243	0,006	0,171	0,009	0,046	0,089	0,012
Keskmine klasterdumis-koefitsient	0,748	0,89	0,716	0,822	0,759	0,696	0,718	0,658
Keskmine ahela pikkus	1,757	1,295	1,628	1,024	1,859	1,222	1,566	1,572
Modulaarsus	0,04114917	0,02664988	0,04627703	0,02807017	0,05093378	0,04184127	0,05724519	0,08999952

Võrgustike parameetrid seltsi tasemel (juhuslikud võrgustikud)

Võrgustiku parameetrid / prooviaala	India	Iraan	Jaapan	Liiva-Putla	Loode-Tammik	Skandinaavia	Vietnam	Zimbabwe
Keskmine klasterdumis-koefitsient	0.760 +/- 0.022	0.891 +/- 0.002	0.743 +/- 0.008	0.803 +/- 0.020	0.780 +/- 0.020	0.734 +/- 0.014	0.736 +/- 0.012	0.671 +/- 0.011
Keskmine ahela pikkus	1.555 +/- 0.020	1.295 +/- 0.001	1.589 +/- 0.015	1.376 +/- 0.013	1.591 +/- 0.014	1.570 +/- 0.023	1.698 +/- 0.053	1.557 +/- 0.003
Modulaarsus	0.042 +/- 0.006	0.024 +/- 0.007	0.050 +/- 0.005	0.026 +/- 0.009	0.046 +/- 0.004	0.043 +/- 0.004	0.059 +/- 0.005	0.066 +/- 0.007

Tabel 6 Võrgustike parameetrid sugukonna tasemel

Võrgustiku parameetrid / prooviala	India	Iraan	Jaapan	Liiva-Putla	Loode-Tammik	Skandinaavia	Vietnam	Zimbabwe
Sõlmede arv	64	81	86	50	58	81	87	85
Lülide arv	966	2460	2374	675	829	1186	1105	1500
R2	0,009	0,172	0,165	0,17	0,003	0,002	0,03	0,002
Keskmine klasterdumis-koefitsient	0,67	0,876	0,835	0,773	0,691	0,557	0,481	0,653
Keskmine ahela pikkus	1,547	1,247	1,364	1,519	1,526	1,713	1,804	1,55
Modulaarsus	0,04	0,01579615	0,01926861	0,05996049	0,0528279	0,06426757	0,0821138	0,04520178

Võrgustike parameetrid sugukonna tasemel (juhuslikud võrgustikud)

Võrgustiku parameetrid / prooviala	India	Iraan	Jaapan	Liiva-Putla	Loode-Tammik	Skandinaavia	Vietnam	Zimbabwe
Keskmine klasterdumis-koefitsient	0.697 +/- 0.010	0.877 +/- 0.001	0.860 +/- 0.005	0.759 +/- 0.015	0.709 +/- 0.005	0.601 +/- 0.015	0.530 +/- 0.009	0.686 +/- 0.009
Keskmine ahela pikkus	1.547 +/- 0.004	1.246 +/- 0.001	1.364 +/- 0.002	1.484 +/- 0.007	1.527 +/- 0.006	1.706 +/- 0.006	1.805 +/- 0.007	1.647 +/- 0.034
Modulaarsus	0.054 +/- 0.006	0.015 +/- 0.007	0.024 +/- 0.003	0.040 +/- 0.006	0.051 +/- 0.006	0.071 +/- 0.007	0.088 +/- 0.006	0.051 +/- 0.004

Tabel 7 Võrgustike parameetrid perekonna tasemel

Võrgustiku parameetrid / prooviala	India	Iraan	Jaapan	Liiva-Putla	Looide-Tammik	Skandinaavia	Vietnam	Zimbabwe
Sõlmede arv	81	92	81	48	83	81	78	85
Lülide arv	2184	2188	1185	666	2281	814	693	1016
R2	0,174	0,084	0,026	0,041	0,152	0,008	0,029	0,013
Keskmine klasterdumis-koefitsient	0,83	0,705	0,511	0,79	0,831	0,362	0,359	0,387
Keskmine ahela pikkus	1,342	1,499	1,675	1,433	1,339	1,872	1,879	1,811
Modulaarsus	0	0,03258717	0,06669408	0,03508802	0,02133391	0,1052338	0,116349	0,09394084

Võrgustike parameetrid perekonna tasemel (juhuslikud võrgustikud)

Võrgustiku parameetrid / prooviala	India	Iraan	Jaapan	Liiva-Putla	Looide-Tammik	Skandinaavia	Vietnam	Zimbabwe
Keskmine klasterdumis-koefitsient	0.867 +/- 0.006	0.731 +/- 0.006	0.559 +/- 0.011	0.794 +/- 0.006	0.866 +/- 0.008	0.416 +/- 0.012	0.406 +/- 0.015	0.451 +/- 0.013
Keskmine ahela pikkus	1.334 +/- 0.001	1.499 +/- 0.003	1.679 +/- 0.012	1.432 +/- 0.004	1.339 +/- 0.001	1.868 +/- 0.010	1.873 +/- 0.009	1.817 +/- 0.008
Modulaarsus	0.023 +/- 0.002	0.040 +/- 0.004	0.074 +/- 0.008	0.035 +/- 0.009	0.023 +/- 0.003	0.114 +/- 0.009	0.129 +/- 0.008	0.098 +/- 0.007

Tabel 8 Võrgustike parameetrid OTU tasemel

Võrgustiku parameetrid / prooviala	India	Iraan	Jaapan	Liiva-Putla	Loode-Tammik	Skandinaavia	Vietnam	Zimbabwe
Sõlmede arv	208	130	117	79	142	93	199	114
Lülide arv	4541	2245	1845	817	2381	947	5121	1616
R²	0,055	0,017	0,004	0,039	0,136	0,228	0,017	0,039
Keskmine klasterdumis-koeffitsient	0,291	0,421	0,366	0,362	0,38	0,342	0,384	0,35
Keskmine ahela pikkus	1,896	1,856	1,803	1,846	1,881	1,912	1,822	1,818
Modulaarsus	0,08736385	0,09357721	0,0779019	0,1063126	0,09450367	0,1071059	0,07277162	0,09450226

Võrgustike parameetrid OTU tasemel (juhuslikud võrgustikud)

Võrgustiku parameetrid / prooviala	India	Iraan	Jaapan	Liiva-Putla	Loode-Tammik	Skandinaavia	Vietnam	Zimbabwe
Keskmine klasterdumis-koeffitsient	0.373 +/- 0.006	0.472 +/- 0.012	0.431 +/- 0.009	0.416 +/- 0.011	0.435 +/- 0.009	0.432 +/- 0.014	0.439 +/- 0.007	0.437 +/- 0.011
Keskmine ahela pikkus	1.890 +/- 0.004	1.859 +/- 0.006	1.800 +/- 0.005	1.843 +/- 0.010	1.881 +/- 0.010	1.934 +/- 0.010	1.820 +/- 0.004	1.822 +/- 0.005
Modulaarsus	0.082 +/- 0.005	0.078 +/- 0.007	0.089 +/- 0.007	0.108 +/- 0.010	0.086 +/- 0.007	0.113 +/- 0.006	0.070 +/- 0.006	0.096 +/- 0.007

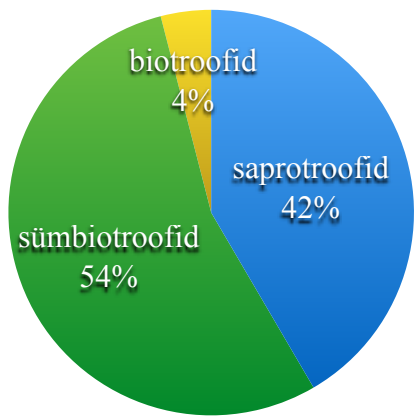
Tabel 9 C-score analüüsi tulemused

Prooviala	C-score	Z	P
India	0,887	1,342	0,265
Iraan	0,908	-1,287	0,325
Jaapan	0,909	-1,782	0,107
Liiva-Putla	0,884	1,892	0,003
Loode-Tammik	0,908	2,529	< 0,001
Soome	0,902	3,39	< 0,001
Vietnam	0,904	1,182	0,275
Zimbabwe	0,878	-0,0457	0,792

Tabel 10 Korrelatsioonide ning tugevate interaktsioonide arv

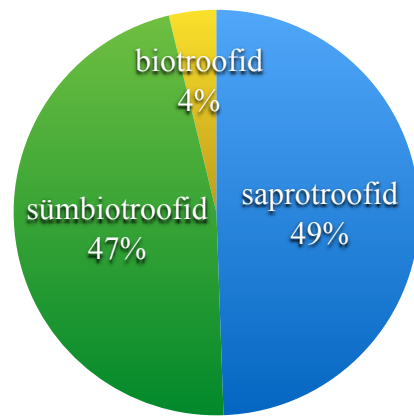
Sellest tabelis on näha iga ala erinevate taksonoomiliste tasemete kohta korrelatsioonide ning oluliste interaktsioonide arv (_C tähistab korrelatsioonide arvu kokku; _E oluliste interaktsioonide arvu; sulgudes olev protsent märgib oluliste interaktsioonide osakaalu kõikidest korrelatsioonidest sellel taksonoomilisel tasemel sellel alal). Olulisi interaktsioone (Spearmani $q > 0,5$; $P < 0,05$) sugukonna tasemele kõikide alade peale kokku oli 0,15%; perekonna tasemel 0,1% ning OTU tasemel 0,14%.

Prooviala	Familia_C	Familia_E	Genus_C	Genus_E	OTU_C	OTU_E
India	2415	3 (0,12%)	2415	6 (0,25%)	69378	80 (0,12%)
Iraan	2850	2 (0,07%)	4278	0 (0%)	43365	45 (0,1%)
Jaapan	2850	7 (0,25%)	3916	4 (0,1%)	16290	61 (0,37%)
Liiva-Putla	1035	4 (0,39%)	1326	3 (0,23%)	24090	42 (0,17%)
Loode-Tammik	2415	2 (0,08%)	2850	3 (0,11%)	20706	48 (0,23%)
Soome	5671	4 (0,07%)	8385	5 (0,06%)	68635	76 (0,11%)
Vietnam	8256	5 (0,06%)	12561	8 (0,06%)	76636	61 (0,08%)
Zimbabwe	3916	17 (0,43%)	5253	14 (0,27%)	27495	79 (0,29%)



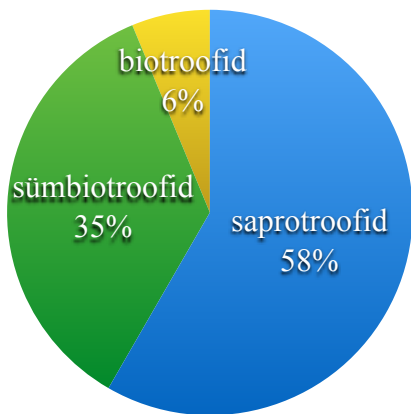
● saprotroofid ● sümbiotroofid ● biotroofid

Joonis 1 Elustiilide jaotumine India proovialal



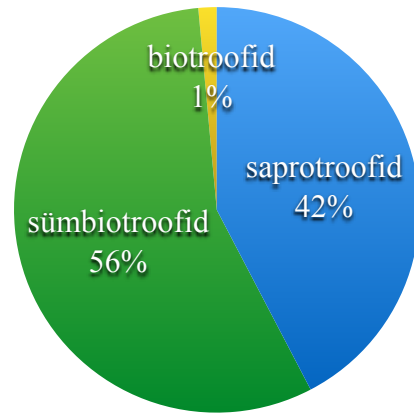
● saprotroofid ● sümbiotroofid ● biotroofid

Joonis 2 Elustiilide jaotumine Iraani proovialal



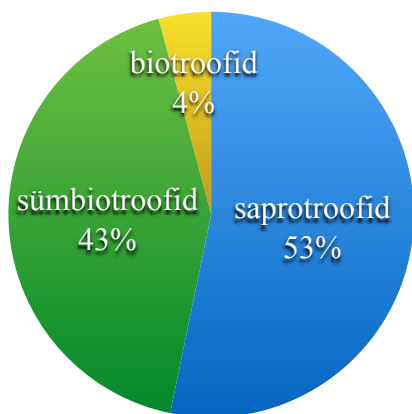
● saprotroofid ● sümbiotroofid ● biotroofid

Joonis 3 Elustiilide jaotumine Jaapani proovialal



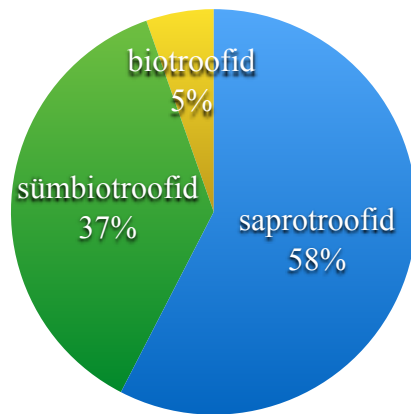
● saprotroofid ● sümbiotroofid ● biotroofid

Joonis 4 Elustiilide jaotumine Liiva-Putla proovialal



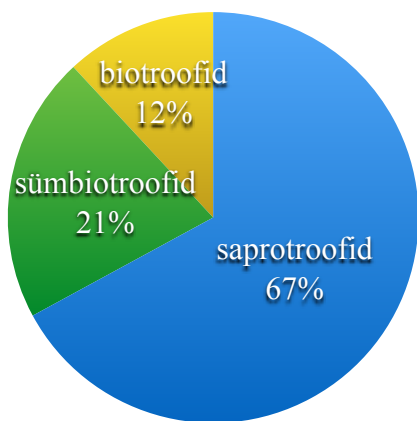
● saprotroofid ● sümbiotroofid ● biotroofid

Joonis 5 Elustiilide jaotumine Loode-Tammiku proovialal



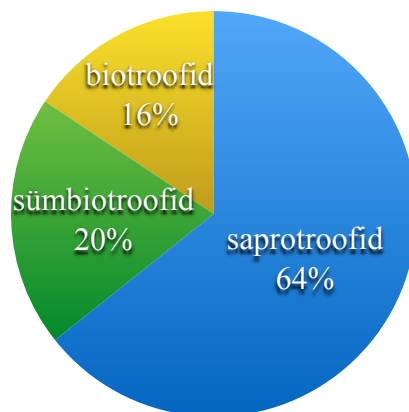
● saprotroofid ● sümbiotroofid ● biotroofid

Joonis 6 Elustiilide jaotumine Soome proovialal



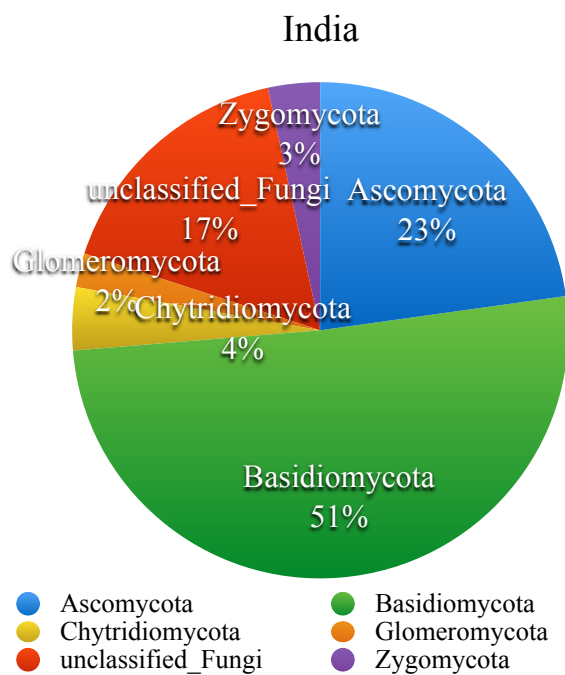
● saprotroofid ● sümbiotroofid ● biotroofid

Joonis 7 Elustiilide jaotumine Vietnami proovialal

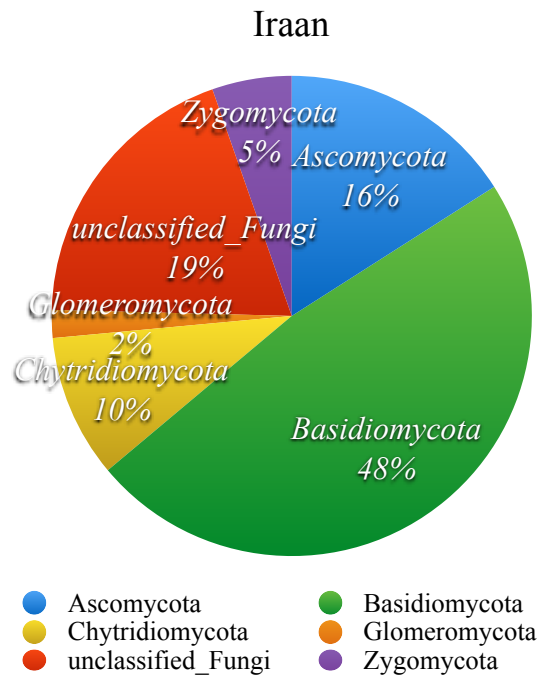


● saprotroofid ● sümbiotroofid ● biotroofid

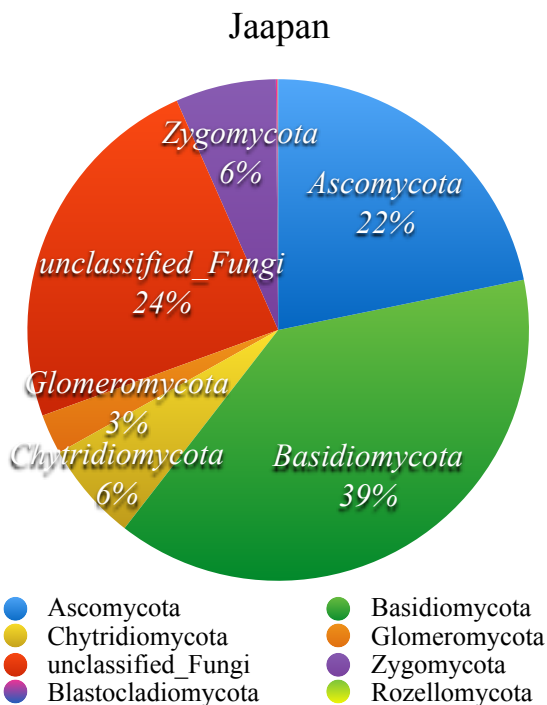
Joonis 8 Elustiilide jaotumine Zimbabwe proovialal



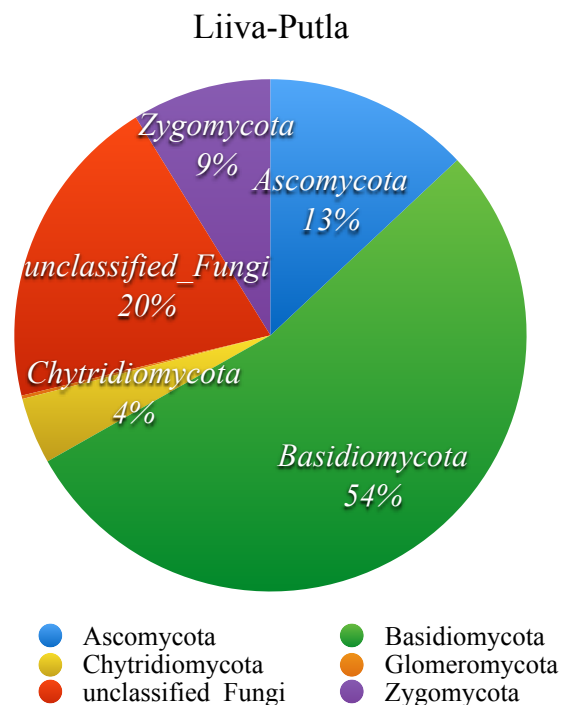
Joonis 9 Hõimkondade jaotus India proovialal



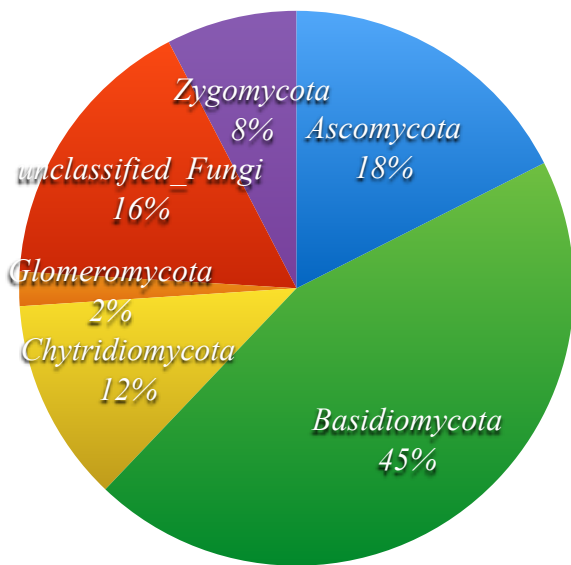
Joonis 10 Hõimkondade jaotus Iraani prooviala



Joonis 11 Hõimkondade jaotus Jaapani proovialal

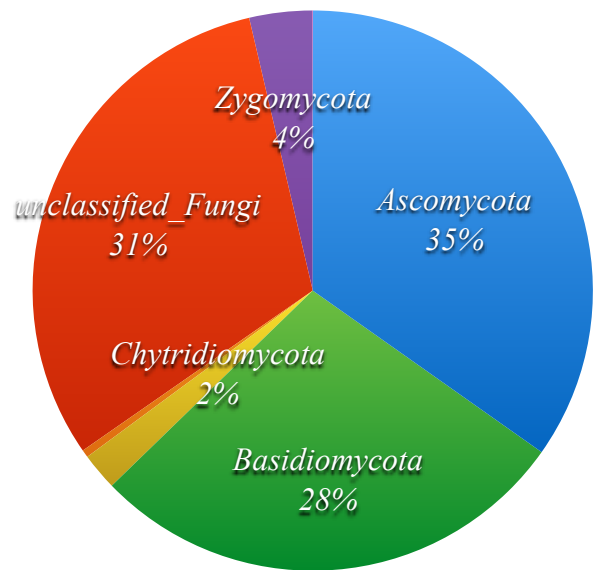


Joonis 12 Hõimkondade jaotus Liiva-Putla proovialal



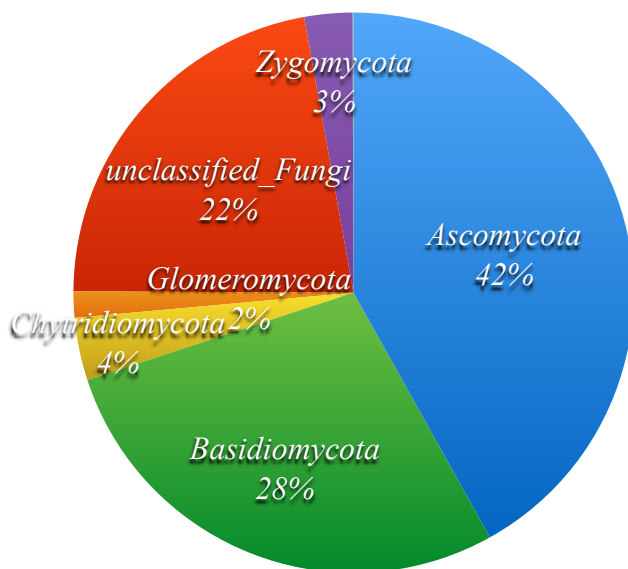
- Ascomycota
- Basidiomycota
- Chytridiomycota
- Glomeromycota
- unclassified_Fungi
- Zygomycota

Joonis 13 Hõimkondade jaotus Loode-Tammiku proovialal



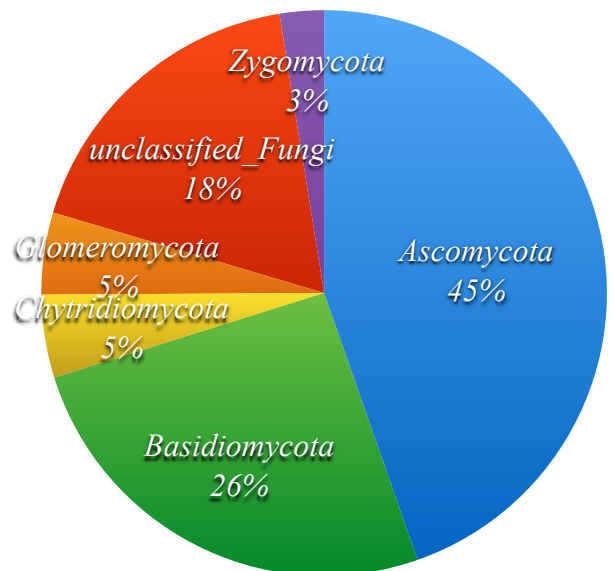
- Ascomycota
- Basidiomycota
- Chytridiomycota
- Glomeromycota
- unclassified_Fungi
- Zygomycota
- Blastocladiomycota

Joonis 14 Hõimkondade jaotus Soome proovialal



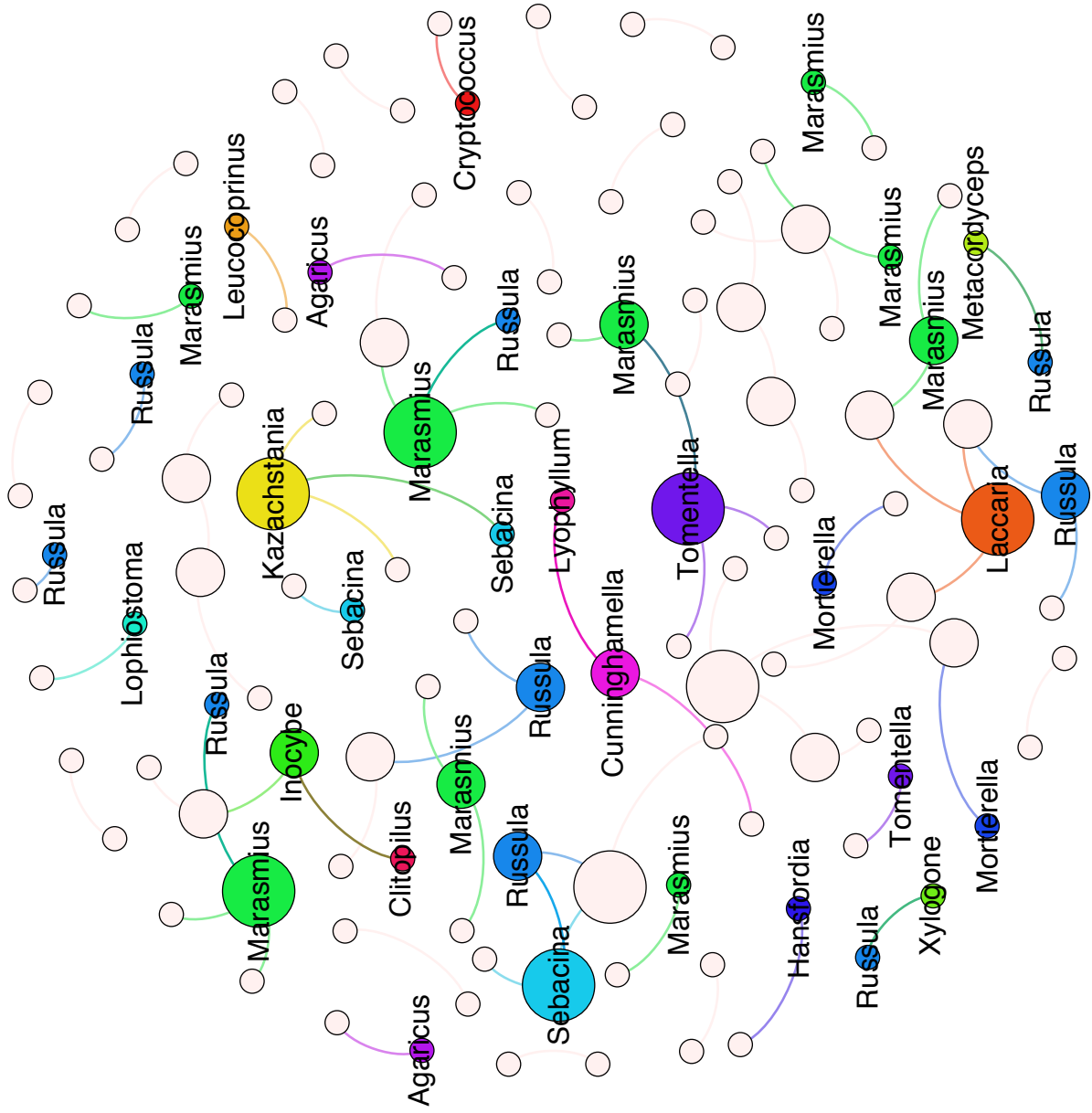
- Ascomycota
- Basidiomycota
- Chytridiomycota
- Glomeromycota
- unclassified_Fungi
- Zygomycota
- Blastocladiomycota
- Rozellomycota

Joonis 15 Hõimkondade jaotus Vietnami proovialal

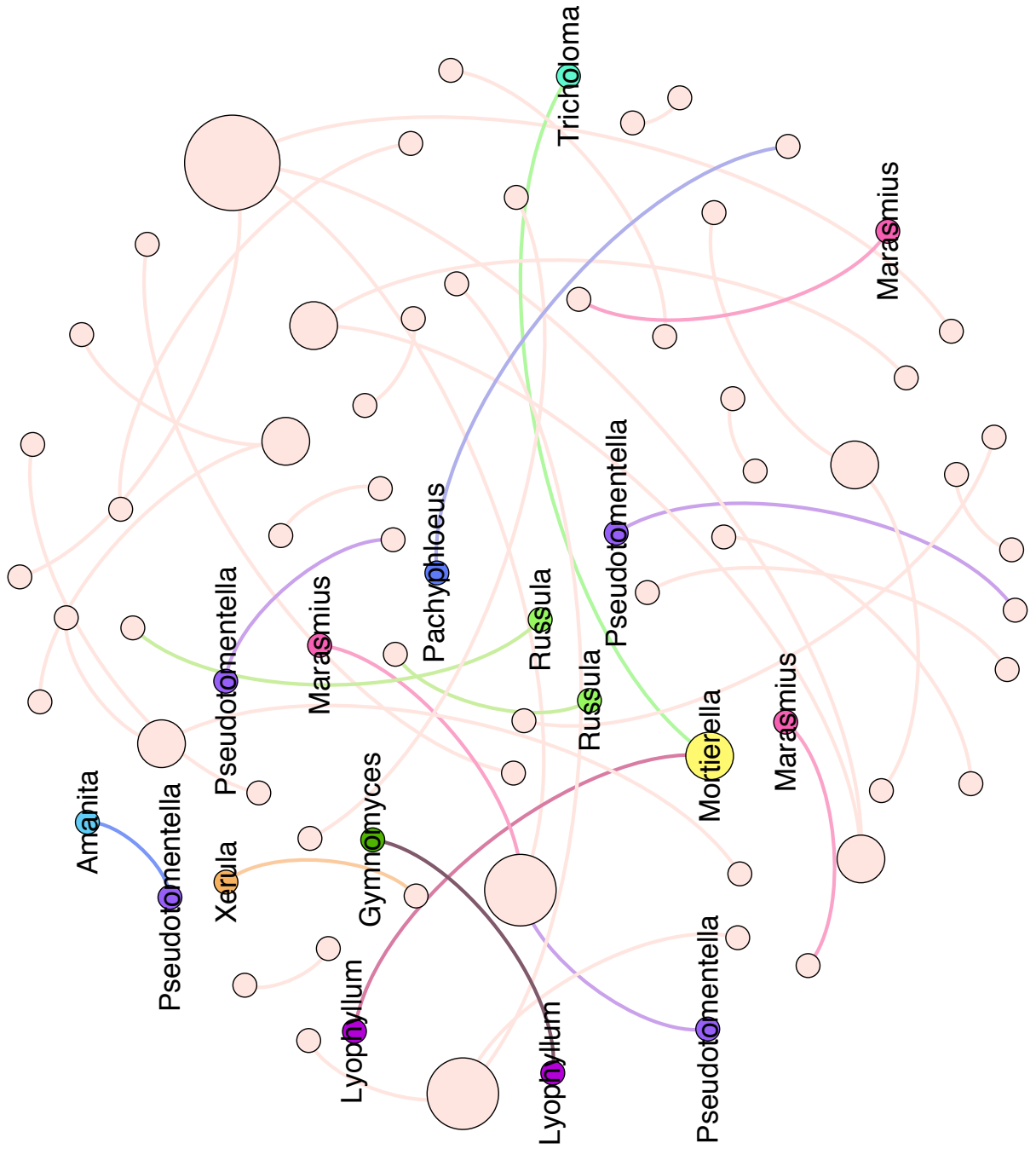


- Ascomycota
- Basidiomycota
- Chytridiomycota
- Glomeromycota
- unclassified_Fungi
- Zygomycota

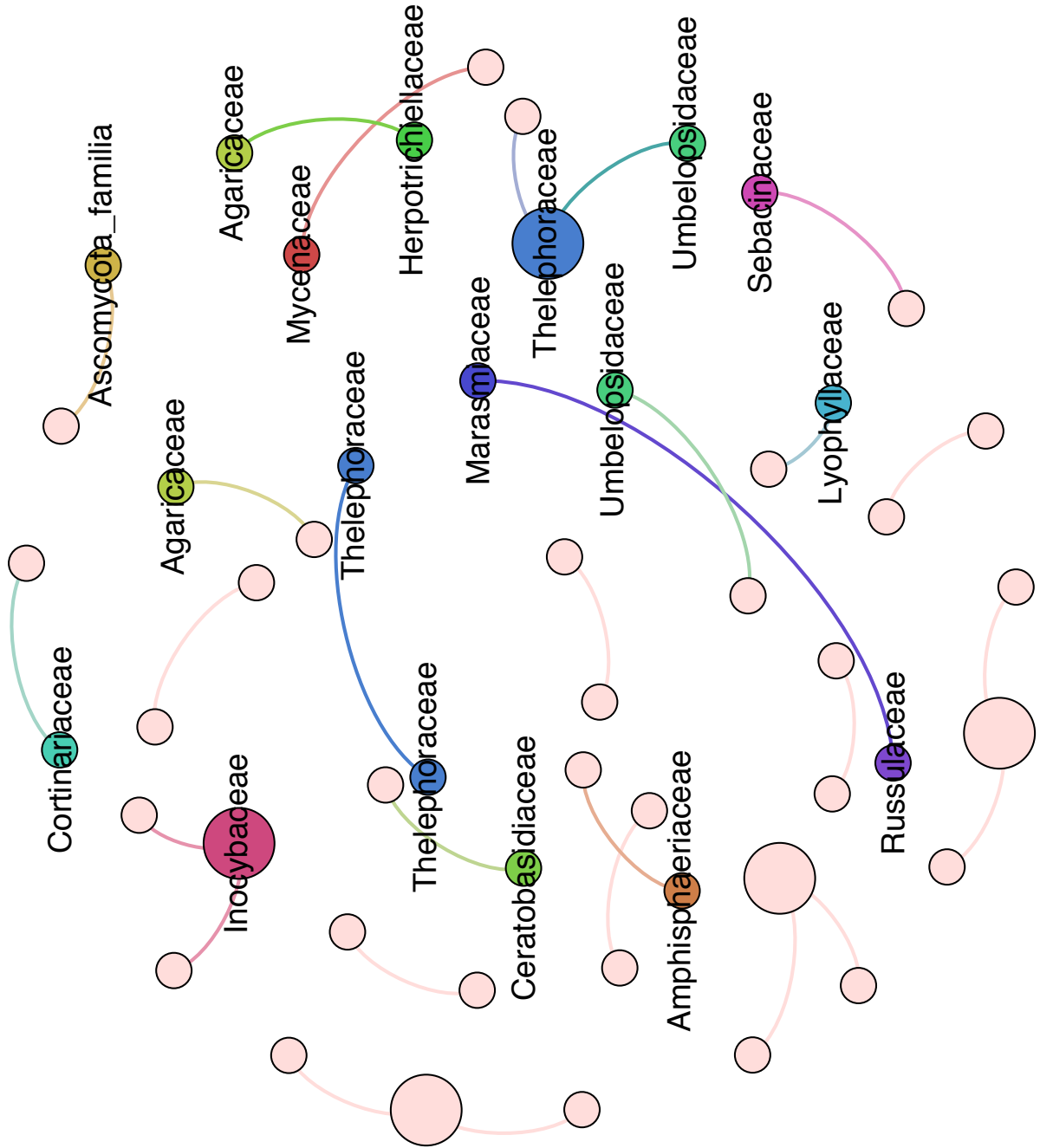
Joonis 16 Hõimkondade jaotus Zimbabwe proovialal



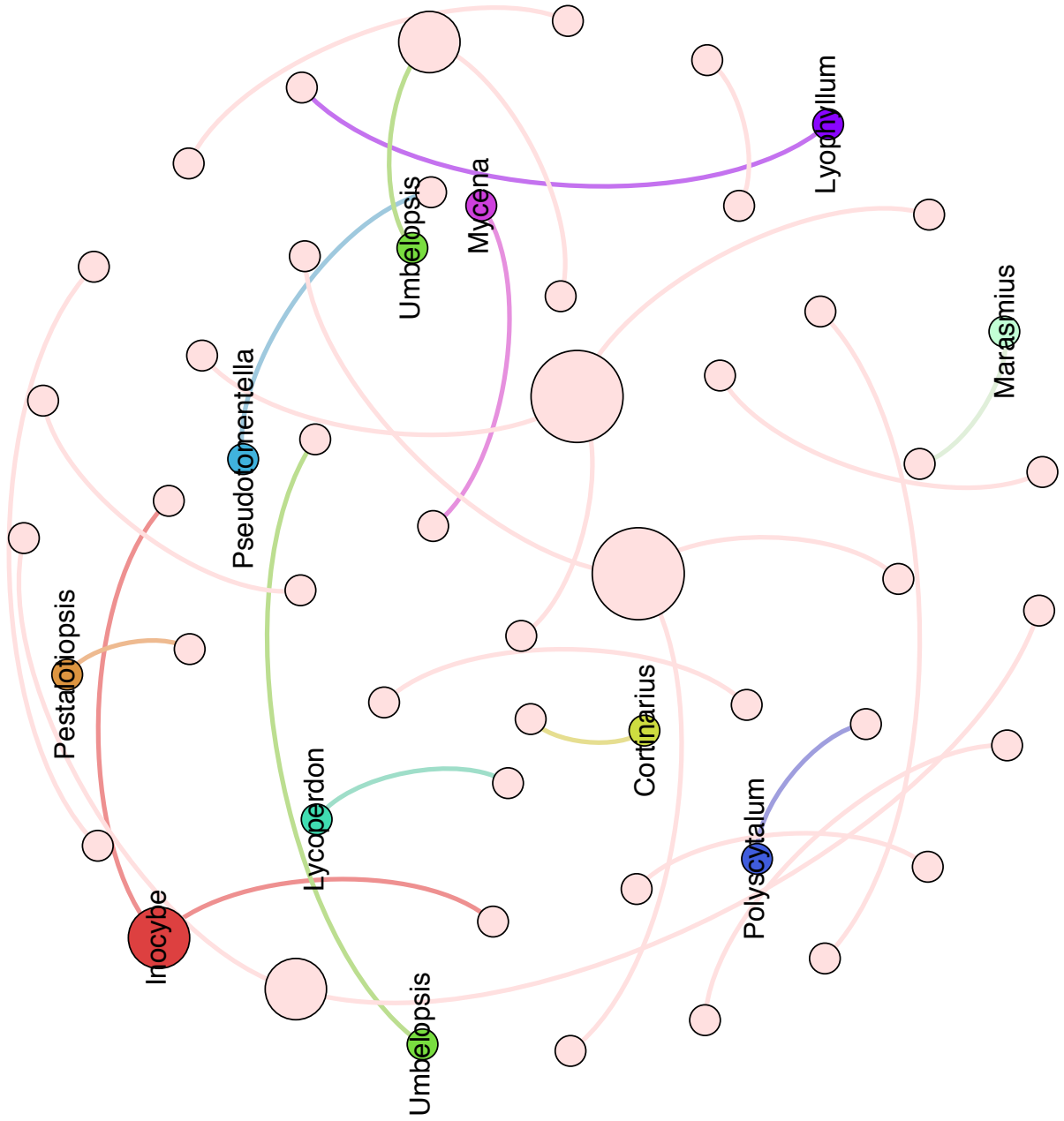
Joonis 20 Iraan *genus_OTU*



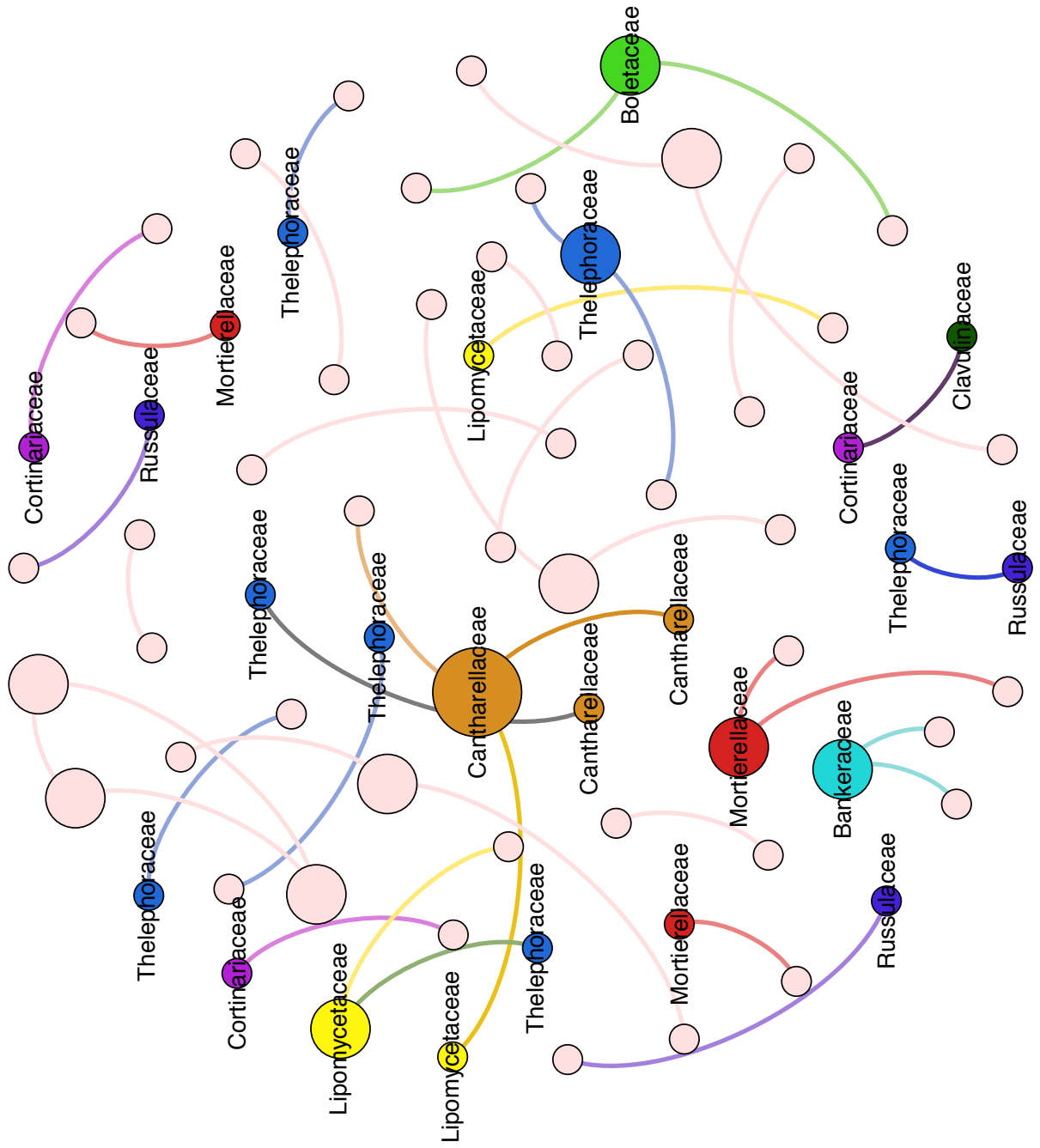
Joonis 21 Jaapan *familia*_OTU



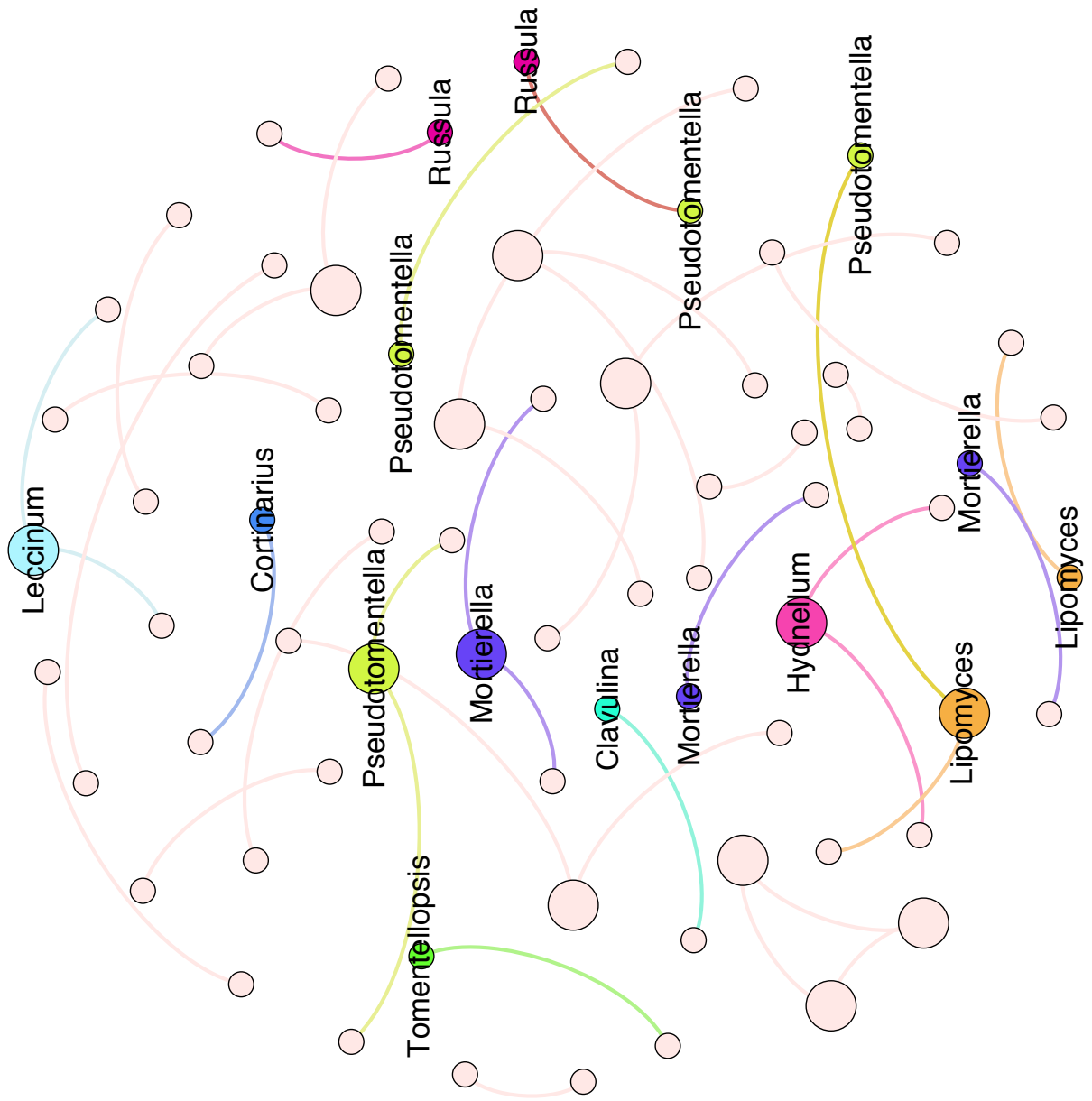
Joonis 22 Jaapan *genus_OTU*



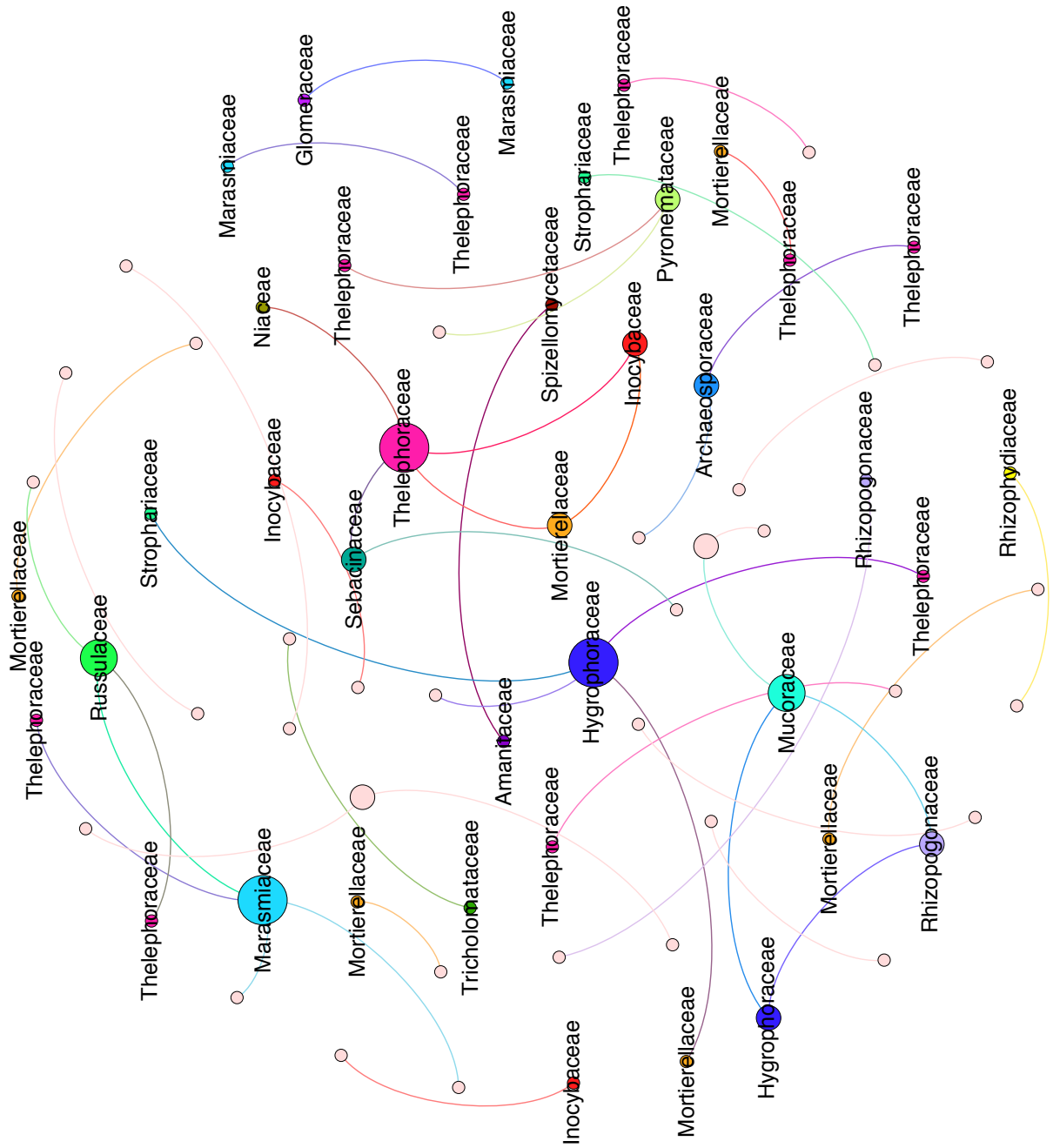
Joonis 23 Liiva-Putla *familia*_OTU



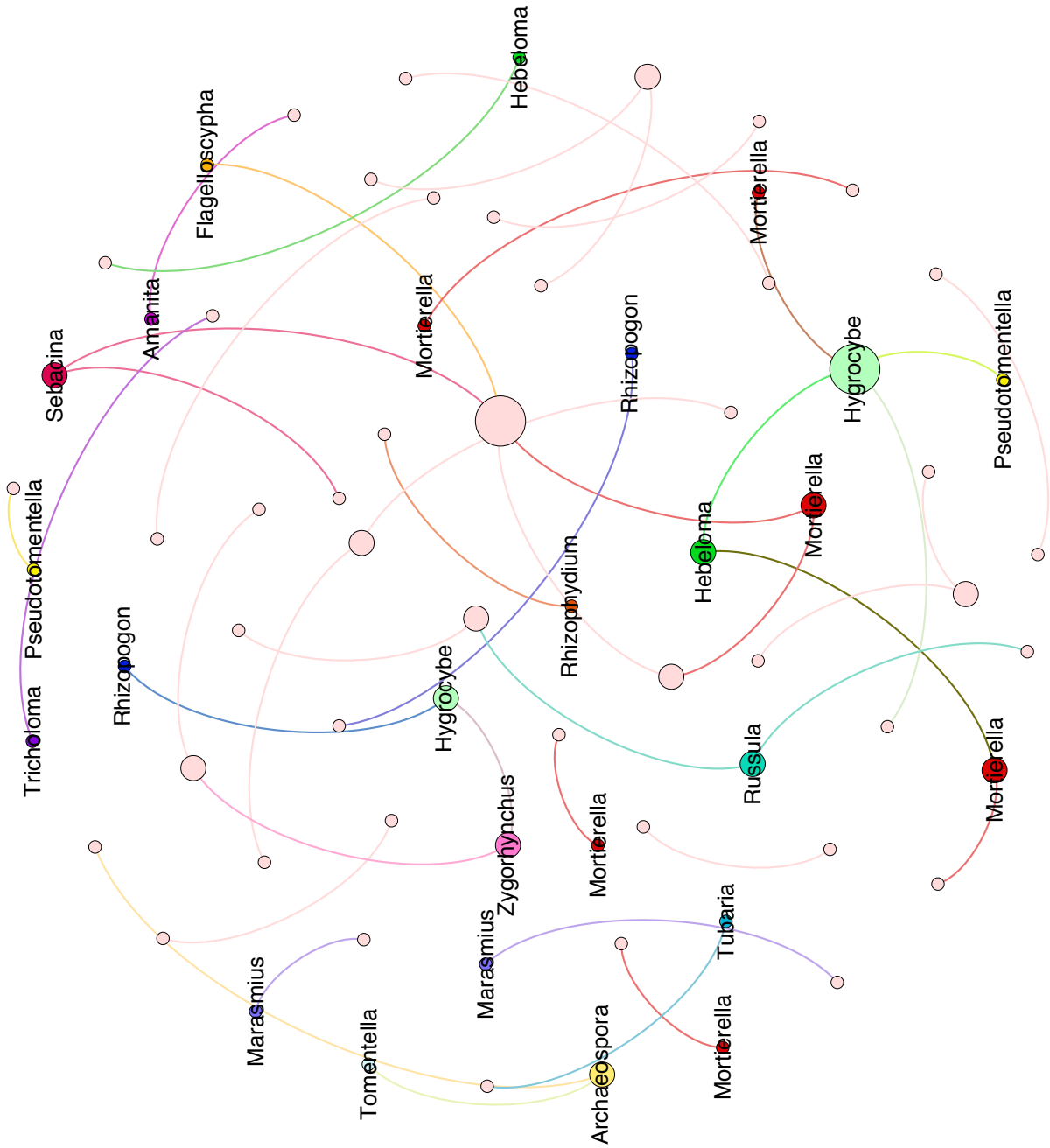
Joonis 24 Liiva-Putla *genus_OTU*



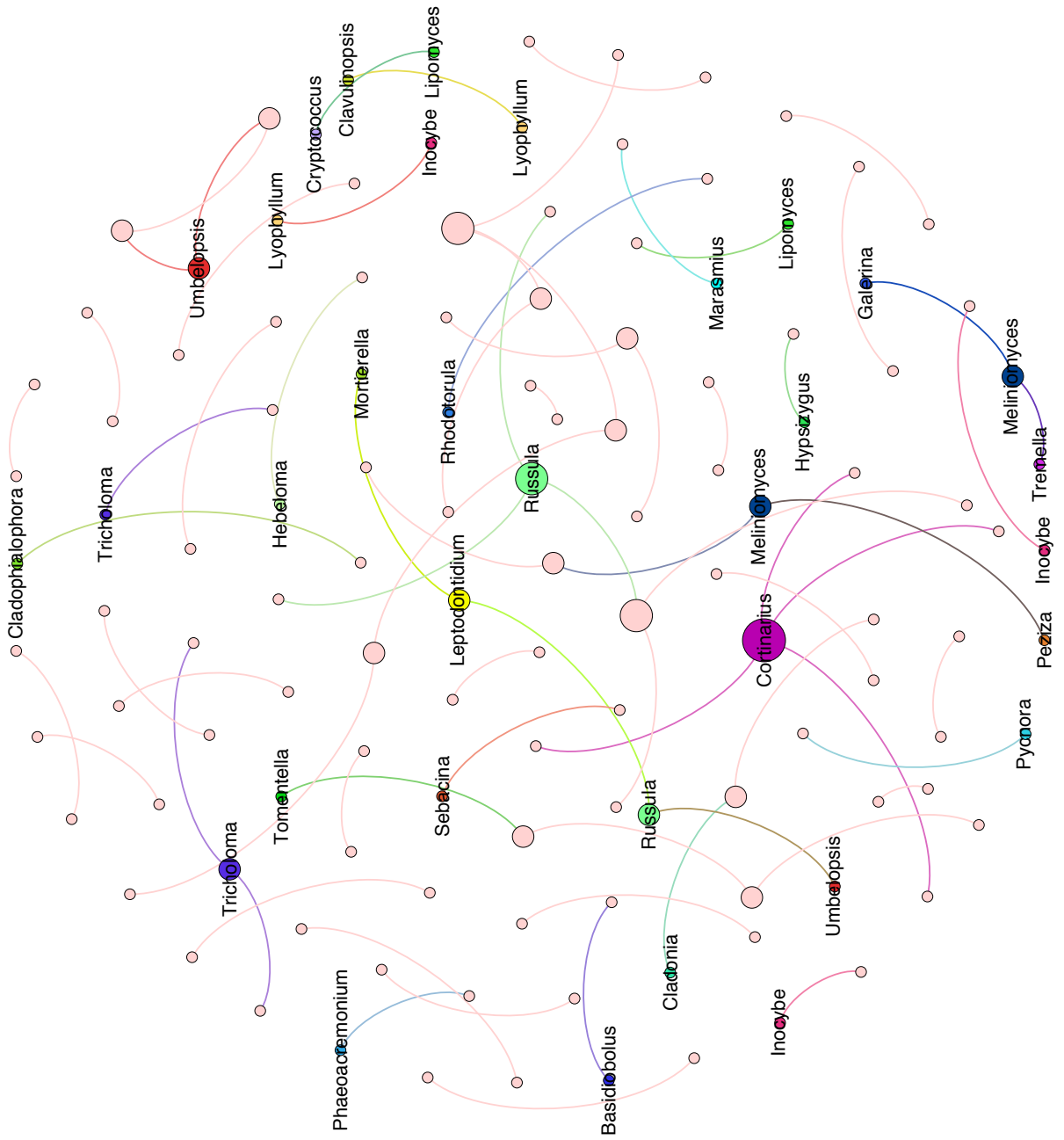
Joonis 25 Loode-Tammik *familia*_OTU



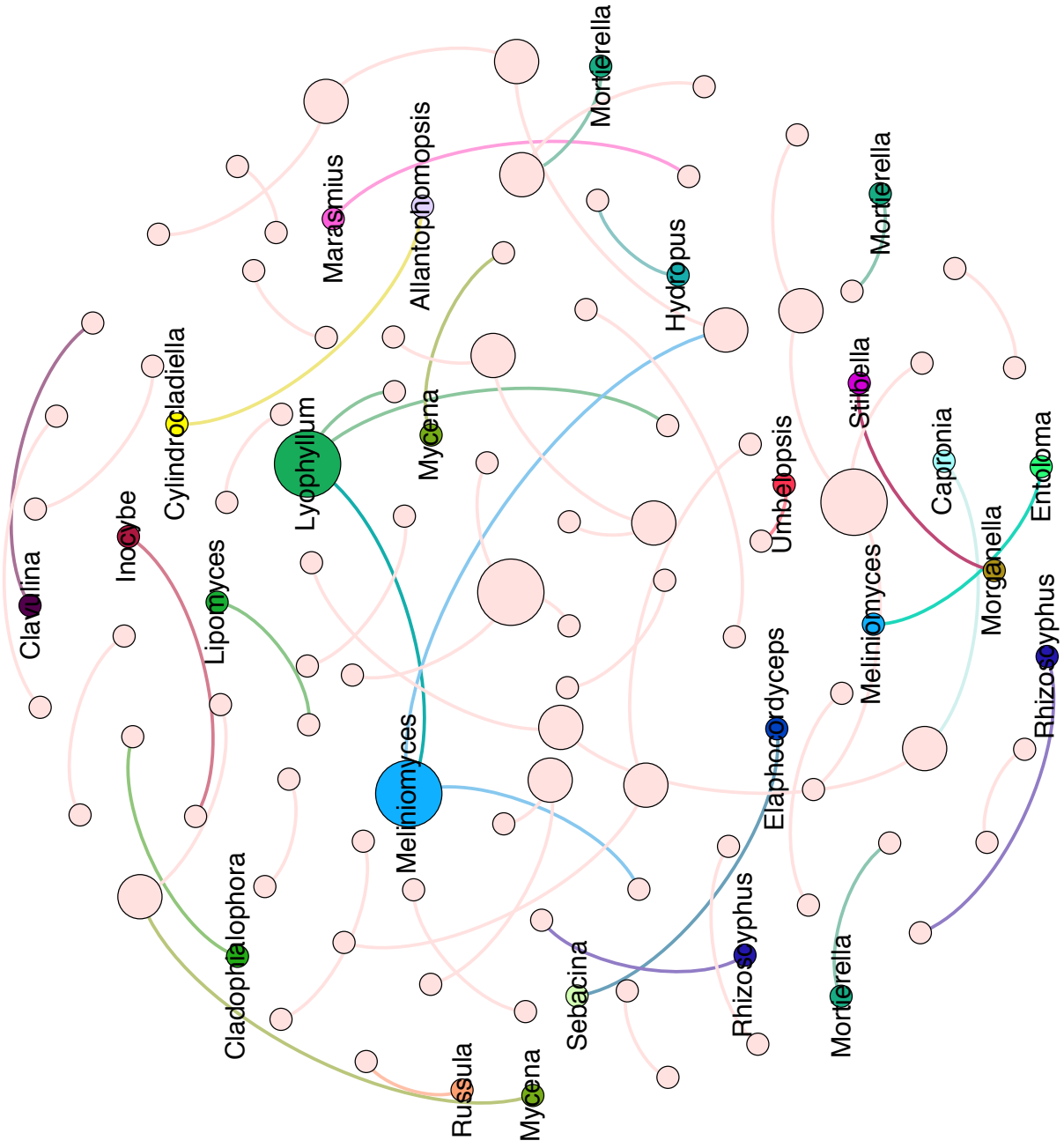
Joonis 26 Loode-Tammik *genus_OTU*



Joonis 28 Soome *genus_OTU*



Joonis 30 Vietnam *genus_OTU*



9. KOKKUVÕTE

Seentel on ökosüsteemides palju olulisi rolle, mis esmapilgul võivad märkamata jääda, kuid ilma milleta kooslus kui süsteem ei suuda toimida. Nad on lagundaja rollis, varustavad sümbiontidena taimi mineraalainetega, kaitsevad taimi patogeenide eest jne. Traditsioonilistel meetoditel mullaseente võrgustikke uurida ei ole paraku võimalik, kuid siin ulatavad abikäe kiiresti arenevad molekulaarsed ning bioinformaatilised võimalused. Kasutades neid meetodeid, viidi antud töö käigus läbi kaheksa erineva mullaseenekoosluse analüüs. Kasutades võrgustikuanalüüsi poolt pakutavaid lahendusi, oli selle töö eesmärk kirjeldada mullas aset leidvaid seentevahelisi interaktsioone. Tulemused näitavad, et homogeensete alade seenekooslused on juhusliku struktuuriga ning seentevahelisi konkurentseid või soodustavaid interaktsioone ei tuvastatud. Samuti ei tuvastatud vaadeldud koosluste puhul modulaarsust ega võrgustiku parameetreid mõjutavaid keskkonnafaktoreid.

10. KASUTATUD KIRJANDUS

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool *Journal of Molecular Biology* 215:403-410

Baldrian P, Kolařík M, Štursová M, Kopecký J, Valášková V, Větrovský T, Žifčáková L, Šnajdr J, Rídl J, Vlček C, Voříšková J (2012). Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *The ISME Journal* 6:248–258

Balint M, Schmidt P-A, Sharma R, Thines M, Schmitt I (2014). An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecology and Evolution* 4:2642-2653

Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N (2012). Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *The ISME Journal* 6:343–351

Bascompte J (2007). Networks in ecology *Basic and Applied Ecology* 8: 485-490

Bascompte J (2009). Disentangling the web of life. *Science* 325: 416-419

Bascompte J, Jordano P (2007). Plant-animal mutualistic networks: the architecture of biodiversity *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 38:567-593

Bastian M, Heymann S, Jacomy M (2009). Gephi: An Open Source Software For Exploring and Manipulating Networks In International AAAI conference on weblogs and social media: San Jose California

Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A, De Wit P, Sanchez-Garcia M, Ebersberger I, de Sousa F, Amend AS, Jumpponen A, Unterseher M, Kristiansson E, Abarenkov K, Bertrand YJK, Sanli K, Eriksson KM, Vik U, Veldre V, Nilsson RH (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS

sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution* 4:914-919

Bouttier J, Di Francesco P, Guitter E (2003). Geodesic distance in planar graphs. *Nuclear Physics* 663:535-567

Burke DJ, Lopez-Gutierrez JC, Smemo KA, Chan CR (2009). Vegetation and soil environment influence the spatial distribution of root-associated fungi in a mature beech-maple forest *Appl Environ Microbiol* 75: 7639-7648

Carlsen T, Aas AB, Lindner D, Vrålstad T, Schumacher T, Kauserud H (2012). Don't make a mistake (g) ke: is tag switching an overlooked source of error in amplicon pyrosequencing studies?. *Fungal Ecology* 5:747-749.

Chen H, Liu Y, Zhang M, Wang G, Qi Z, Bridgewater L, Ragan MA, Pang X (2015). A Filifactor alocis-centered co-occurrence group associates with periodontitis across different oral habitats. *Scientific Reports* 5:9053

Clements FE (1916). *Plant succession: an analysis of the development of vegetation*. Carnegie Institution of Washington, Washington.

Coince A, Caël O, Bach C, Lengellé J, Cruaud C, Gavory F, Morin E, Murat C, Marçais B, Buée M (2013). Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. *Fungal Ecology* 6: 223-235

Deng Y, Jiang Y-H, Yang Y, He Z, Luo F, Zhou J (2012). Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinformatics* 13:113

Derocles SA, Evans DM, Nichols PC, Evans SA, Lunt DH (2015). Determining plant-leaf miner-parasitoid interactions: a DNA barcoding approach. *PLoS ONE* 10: e0117872

Diamond JM (1975). The island dilemma: lessons of modern biogeographic studies for the design of natural reserves. *Biological conservation* 7:129-146

Dupont YL, Olesen JM (2009). Ecological modules and roles of species in heathland plant-insect flower visitor networks. *Journal of Animal Ecology* 78: 346-353

Edgar RC (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27:2194-2200

Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, Robeson M, Edwards RA, Felts B, Rayhawk S, Knight R, Rohwer F, Jackson RB (2007). Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7059-7066

Gleason HA (1926). The individualistic concept of the plant association. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 53:7–26

Gotelli NJ, Entsminger GL (2000). EcoSim: Null models software for ecology Version 50 Acquired Intelligence Inc & Kesey-Bear <http://homepages.together.net/~gentsmin/ecosim.htm>

Gotelli NJ, Graves GR. (1996) *Null Models in Ecology*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., USA. <http://www.uvm.edu/~ngotelli/nullmodelspace.html>

Jacquemyn H, Merckx V, Brys R, Tyteca D, Cammue BPA, Honnay O, Lievens B (2011). Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis* (*Orchidaceae*). *New Phytologist* 192:518–528

Jordano P (1987). Patterns in mutualistic interactions in pollination and seed dispersal: connectance dependence asymmetries and coevolution. *American Naturalist* 129:657-677

Kashtan N, Alon U (2005). Spontaneous evolution of modularity and network motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:13773-13778

Kéfi S, Berlow EL, Wieters Evie A, Joppa LN, Wood SA, Brose U, Navarrete S A (2015). Network structure beyond food webs: mapping non-trophic and trophic interactions on Chilean rocky shores. *Ecology* 96:291–303

Kennedy P, Nguyen N, Cohen H, Peay K (2014). Missing checkerboards? An absence of competitive signal in *Alnus*-associated ectomycorrhizal fungal communities. *PeerJ* 2:e686

Koide RT, Xu B, Sharda J, Lekberg Y, Ostiguy N (2005). Evidence of species interactions within an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytologist* 165:305–316

Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott JA, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiß M, Larsson K-H (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi. *Molecular Ecology* DOI:10.1111/mec.12481

Lupatini M, Suleiman AK, Jacques RJ, Antonioli ZI, de Siqueira Ferreira A, Kuramae EE, Roesch LF (2014). Network topology reveals high connectance levels and few key microbial genera within soils. *Frontiers in Environmental Science* 2:10

Martin KJ, Rygielwicz PT (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5:28

- Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C, Selosse MA (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology* 21:5098–5109
- Masella AP, Bartram AK, Truszkowski JM, Brown DG, Neufeld JD (2012). PANDAseq: PAired-eND Assembler for Illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13:31
- Maslov S, Sneppen K (2002) Specificity and stability in topology of protein networks. *Science* 296:910–913
- Montoya JM, Pimm SL, Solé RV (2006). Ecological networks and their fragility. *Nature* 442: 259-264
- Nakamura Y, Cochrane G, Karsch-Mizrachi I (2013). The international nucleotide sequence database collaboration. *Nucleic acids research* 41:D21-D24
- Newman MEJ (2006). Finding community structure in networks using the eigenvectors of matrices. *Physical Review E* 74:036104
- Ovaskainen O, Hottola J, Siitonen J (2010). Modeling species co-occurrence by multivariate logistic regression generates new hypotheses on fungal interactions. *Ecology* 91:2514-2521
- Paungfoo-Lonhienne C, Yeoh YK, Kasinadhuni NRP, Lonhienne TG, Robinson N, Hugenholtz P, Ragan MA, Schmidt S (2015). Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere. *Scientific reports* DOI:10.1038/srep08678
- Pickles BJ, Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ (2012). Spatial analysis of ectomycorrhizal fungi reveals that root tip communities are structured by competitive interactions. *Molecular ecology* 21:5110-5123

Proulx SR, Promislow DEL, Phillips PC (2005). Network thinking in ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 345-353

Rajala T, Peltoniemi M, Hantula J, Mäkipää R, Pennanen T (2011). RNA reveals a succession of active fungi during the decay of Norway spruce logs. *Fungal Ecology* 4:437-448

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009). Introducing mothur: Open-Source Platform-Independent Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7537-7541

Stone L, Roberts A (1990). The checkerboard score and species distributions. *Oecologia* 85:74-79

Strogatz SH (2001). Exploring complex networks. *Nature* 410: 268-276

Tedersoo L, Smith ME (2013). Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews* 27:83-99

Tedersoo L, Bahram M, Polme S, Koljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A, Smith ME, Sharp C, Saluveer E, Saitta A, Rosas M, Riit T, Ratkowsky D, Pritsch K, Poldmaa K, Piepenbring M, Phosri C, Peterson M, Parts K, Partel K, Otsing E, Nouhra E, Njouonkou AL, Nilsson RH, Morgado LN, Mayor J, May TW, Majuakim L, Lodge DJ, Lee SS, Larsson K-H, Kohout P, Hosaka K, Hiiesalu I, Henkel TW, Harend H, Guo L-d, Greslebin A, Grelet G, Geml J, Gates G, Dunstan W, Dunk C, Drenkhan R, Dearnaley J, De Kesel A, Dang T, Chen X, Buegger F, Brearley FQ, Bonito G, Anslan S, Abell S, Abarenkov K (2014a). Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346: 1078

Tedersoo L, Harend H, Buegger F, Pritsch K, Saar I, Kõljalg U (2014b). Stable isotope analysis, field observations and synthesis experiments suggest that *Odontia* is a non-mycorrhizal sister genus of *Tomentella* and *Thelephora*. *Fungal Ecology* 11:80-90

Tedersoo L, Anslan S, Bahram M, Põlme S, Riit T, Liiv I, Kõljalg U, Kisand V, Nilsson RH, Hildebrand F, Bork P, Abarenkov K (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pair - barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycologyKeys* 10:1-43

Thébault E, Fontaine C, (2010). Stability of ecological communities and the architecture of mutualistic and trophic networks. *Science* 329:853-856

Toju H, Guimarães PR, Olesen JM, Thompson JN (2014). Assembly of complex plant–fungus networks. *Nature Communications* 5:5273

Vestergård M, Henry F, Rangel-Castro JI, Michelsen A, Prosser JI, Christensen S (2008). Rhizosphere bacterial community composition responds to arbuscular mycorrhiza but not to reductions in microbial activity induced by foliar cutting. *FEMS Microbiology Ecology* 64:78-89

White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: Innis MA Gelfand DH (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Academic Press: London 315-322

Williams RJ, Howe A, Hofmockel KS (2014). Demonstrating microbial co-occurrence pattern analyses within and between ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 5:1-10

Wubet T, Christ S, Schöning I, Boch S, Gawlich M, Schnabel B, Fischer M, Buscot F (2012). Differences in soil fungal communities between European beech (*Fagus sylvatica* L.) dominated forests are related to soil and understory vegetation. *PLoS ONE* 7:e47500

Co-occurrence networks in soil fungal communities

Helery Harend

Summary

Fungi have diverse ecological roles in ecosystems. They participate in mineral cycling, in carbon cycle and have a pivotal role in decomposition and as mycorrhizal symbionts. Traditional identification methods are not suitable for shedding light into the complex soil fungal communities. There are fast developing molecular techniques and bioinformatic tools, which provide us opportunities to understand belowground fungal communities. Using these methods, network analysis for eight different fungal communities was carried out. Using the prospects of network analysis tool, the aim of my thesis was to describe the functioning of soil fungal community as a network of pairwise interactions. The results indicate that the fungal communities are assembled randomly in homogeneous areas, with no competitive or facilitative interactions among fungal species. Also the modularity values of the fungal communities were low and the factors affecting the network properties at the global scale remained undetected.

Tänuavaldused

Avaldan tänu oma juhendajatele Leho Tedersoole ja Mohammad Bahramile igakülgse abi ning nõuannete eest. Samuti tänan kõiki mükoloogia õppetooli liikmeid soovitude ning panuse eest töösse. Suured tänuavaldused kannatlikkuse ning toetuse eest ka perele.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Helery Harend (sünnikuupäev: 19.10.1990),

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

„Ökoloogilised võrgustikud mullaseente kooslustes”, mille juhendajad on Leho Tedersoo ja Mohammad Bahram,

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

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

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

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

Tartus, 28.05.2015