

Mikrobien kulkeutuminen talitiaisien (*Parus major*) ravintoketjussa

Sameli Piirto

Pro gradu -tutkielma

Oulun yliopisto

Biologian tutkinto-ohjelma

Syyskuu 2021

1 JOHDANTO.....	1
1.1 Mikrobiomi.....	1
1.2 Mikrobit ravintoketjussa.....	2
1.2.1 Kasvien mikrobisto.....	2
1.2.2 Kasvinsyöjät: perhostoukat.....	2
1.2.3 Peto: Talitiainen (<i>Parus major</i>).....	3
1.3 Mikrobyhteisöjen metagenominen tutkimus NGS- ja 16S-tekniologialla.....	4
1.4 Tutkimuskysymykset & hypoteesit.....	5
2 MATERIAALIT & MENETELMÄT.....	7
2.1 Tutkimusasetelma.....	7
2.2 Kenttätyöt.....	7
2.3 Molekyyliomenetelmät.....	8
2.3.1 DNA eristys.....	8
2.3.2 PCR & Sekvensointi.....	10
2.4 Bioinformatiikka.....	11
3 TULOKSET.....	12
3.1. Mikrobiomien koostumus.....	12
3.2. Mikrobiston rakenne ravintoketjussa.....	15
3.3. Ympäristömuuttujien vaikutus mikrobiomiin.....	16
4 POHDINTA.....	19
4.1. Kasvien, toukkien ja lintujen mikrobiomi.....	19
4.2. Ravintoketjun mikrobisto.....	20
4.3 Ympäristömuuttujien vaikutus mikrobiomiin.....	21
4.4 Virhelähteet.....	22
4.5 Johtopäätökset.....	23
4.6 Suositukset.....	23
5 YHTEENVETO.....	24
6 KIITOKSET.....	25
7 KIRJALLISUUS.....	25
8 LIITTEET.....	29

1 Johdanto

1.1 Mikrobiomi

Valtaosa eläimistä kerryttää elinkaarensa aikana pinnoilleen ja/tai suolistoonsa mikrobiyhteisöjä, jotka koostuvat bakteereista, viruksista ja vähemmissä määrin myös sienistä ja arkeoneista (Baedke ym. 2020, Cathey ym. 2020). Näitä eliön kanssa vuorovaikuttavaa mikrobipopulaatiota kutsutaan mikrobiomiksi. Eliön syntyessä sen iholle ja suolistoon alkaa muodostua mikrobiyhteisöjä, jotka muokkautuvat eliön altistuessa ympäristönsä mikrobistolle, joten nuoren yksilön mikrobiomi voi erota merkittävästi vanhemman yksilön kartuttamasta lajistosta (Chaturvedi ym. 2017, Teyssier ym. 2018). Elinympäristön biodiversiteetillä onkin suuri vaikutus siinä, kuinka paljon eliö altistuu erilaisille mikrobeille (Laforest-Lapointe ym. 2017, Teyssier ym. 2018). Ympäristön vahva vaikutus voi aiheuttaa alueellisia eroja (biogeografia) populaatioiden mikrobiomiin (Hird ym. 2014), mikä synnyttää populaatioihin paikallisia sopeumia ja ajaa jopa evoluutiota (Chaturvedi ym. 2017, Gaulke ym. 2018).

Eläimen käyttämä ravinto on yksi tärkeimpiä mikrobiomin muokkaajia (Hammer ym. 2017, Chaturvedi ym. 2017, Piewgam ym. 2018, Hannula ym. 2019, Jones ym. 2019), sillä syödessään eläin sisäistää ympäristönsä mikrobistoa. Ravinnon mukana kulkeutuvia mikrobeja voi integroitua eliön suoliston pinnoilla elävään bakteeripopulaatioon. Symbioottiset mikrobit ovat etenkin suolistossa alttiita isäntäeliönsä immuunipuolustukselle, jolloin interaktiossa korostuvat isäntäeliön yksilökohtaiset genomin toiminnan vaihtelut (Benson ym. 2010). Nämä genomiset tekijät tunnetaan immuunipuolustuksen kannalta tärkeinä säätelijöinä, sillä ne aiheuttavat taudinaiheuttajien torjunnassa yksilöllisiä eroja; samat mekanismit heijastuvat siihen, mitkä mikrobilajit (tai -kannat, engl. *strain*) eliön immuunipuolustus hyväksyy symbionteiksi. Mikrobiomi sopeutuu isäntänsä sisäiseen ympäristöön, joten muutokset ravinnossa, hormonitoiminnassa, immunitetissa ja muussa aineenvaihdunnassa voivat muuttaa myös symbionttien keskinäisiä vuorovaikutussuhteita.

Ihon ja muut pinnat kolonisoivilla mikrobeilla on omat ekologiset lokeronsa, mutta suurin mikrobisolujen tiheys saavutetaan ruoansulatuskanavassa, jonka pinnoilla elävä mikrobiyhteisö, suolistomikrobisto, on tärkein eläimillä vaikuttava mikrobitoiminnan keskus (Sender ym. 2016). Symbionttisten bakteerien tiedetään auttavan eläimillä ruoansulatuksessa ja tuotettavan ravintoaineita, stimuloivan immuunipuolustusta (Chung ym. 2012, Hanski 2014) sekä

vaikuttavan eliön kasvuun (Ruokolainen ym. 2016, Teyssier ym. 2018, Kohl ym. 2018), käyttäytymiseen (Dinan ym. 2015) ja jopa evoluutioon (Chaturvedi ym. 2017, Gaulke ym. 2018, Huitzil ym. 2018). Mikrobiomin kokonaisvaltainen vaikutus isäntäänsä on johtanut ajatukseen, että isäntäeliö ja mikrobiomi tulisi tulkita yhdeksi biologiseksi kokonaisuudeksi: superorganismiksi (holobiontti) (Baedke ym. 2020, Carthey ym. 2020). Kysymykset siitä, mitkä tekijät vaikuttavat eliön mikrobiomin lajistoon ovat tärkeitä, sillä tutkimusten nojalla symbiontit ovat äärimmäisen merkittävässä vuorovaikutuksessa isäntäeliönsä kanssa ja aiheesta löydetään jatkuvasti uutta tietoa.

1.2 Mikrobit ravintoketjussa

1.2.1 Kasvien mikrobisto

Kasvit ovat perusta maanpäällisille ekosysteemeille ja ovat lukemattomien ravintoketjujen ensimmäinen trofiataso. Kasvit ovat symbioottisissa vuorovaikutussuhteissa monimuotoisen mikrobijoukon kanssa, joista eniten on tutkittu bakteereja ja sieniä (Hassani ym. 2018). Kasvien symbiontit jaetaan niiden asuttaman kasvinosan mukaan: ulkopinnoilla, enimmäkseen lehdillä eläviin epifyytteihin, kasvin solukoissa eläviin endofyytteihin sekä juuristossa ja niiden ympärillä elävään mikrobiyhteisöön, ritsosfääriin. Ympäristön monimuotoisuus (Laforest-Lapointe ym. 2016) maaperän koostumus (Hannula ym. 2019), lämpötila, kosteus (Laforest-Lapointe ym. 2017) ja ovat päätekijöitä siihen, millainen mikrobiomi kasveille kehittyy. Symbioottisten mikrobien toiminnan on havaittu parantavan kasvien aineenvaihduntaa, kasvua, siementuotantoa, ja stressinsietokykyä (Hassani ym. 2018). Esimerkiksi männyn (*Pinus sylvestris*) silmuissa symbionttina elävä *Metylobacteria extorquens* parantaa männyntaimen kasvua (Pohjanen ym. 2014). Herbivoreille välittyvät kasvimikrobit ovat jossain tapauksissa, kuten ihmisellä, tärkeä osa kasvinsyöjän suolistomikrobistoa (Piewngam ym. 2018). Mikrobien kulkeutumisen tutkiminen ravintoketjussa on siis mielekäästä ja voi tuoda lisätietoa siinä välittyvien mikrobien merkityksestä sekä ilmiön laajuudesta luonnossa.

1.2.2 Kasvinsyöjät: perhostoukat

Perhoset (Lepidoptera) on maailman kolmanneksi suurin hyönteislahko, johon luulua yli 150 000 tieteen tuntemaa lajia (Van Nieukerken ym. 2011). Toukkavaiheessa kasviravintoa käyttävät lajit ovat ekologisesti merkittäviä herbivoreja sekä ravinnonlähde tuhansille niistä saalistaville lajeille, joten toukkien kokonaisvaikutus elinympäristöönsä on huomattava. Perhostoukkien mikrobiomia ja ravinnon sisältämän mikrobiston vaikutuksia toukkiin on tutkittu

laajalti viimeisen vuosikymmenen aikana (Ruokolainen ym. 2016, Chaturvedi ym. 2017, Hammer ym. 2017, Hannula ym. 2019). Perhostoukkien suolisto on suhteellisen lyhyt, yksinkertainen ja emäksinen (pH > 10), ja ravinto kulkeutuu nopeasti sen läpi. Hammer ym. (2017), Chaturvedi ym. (2017) ja Jones ym. (2019) ovat havainneet näiden seikkojen tekevän perhostoukkien suolistosta vaikeasti kolonisoitavan ympäristön mikrobeille. Edellä mainittujen tutkimusten perusteella, vastoin yleistä käsitystä, perhostoukat eivät näytä panostavan suolistossaan sijaitsevan mikrobiyhteisön ylläpitoon, joten niiltä ei havaita vakiintunutta mikrobipopulaattiorakennetta, vaan toukissa havaitut bakteerilajit olivat peräisin niiden ravintokasveista. Tämä on todettu perhostoukkien ulosteesta (Hammer ym. 2017, Chaturvedi ym. 2017) ja kokonaisista homogenoiduista perhostoukista (Chaturvedi ym. 2017, Hannula ym. 2019), joten linkki ensimmäisen ja toisen trofiatason välillä on todettu. Toukkien sisältämän mikrobimateriaalin siirtymisestä eteenpäin ravintoketjussa ei ole vielä paljoa tutkimusta.

1.2.3 Peto: Talitiainen (*Parus major*)

Talitiainen on yksi Euraasian yleisimmistä lintulajeista ja sen ekologiaa ja ravintoa on tutkittu kattavasti. Se on kolopesijä ja viihtyy niin urbaanissa ympäristössä kuin kaikentyypisissä metsissäkin. Talitiaiset munivat touko-kesäkuun alussa 6–12 munaa, joita ne hautovat noin kaksi viikkoa. Poikasten kuoriutuminen ajoittuu perhostoukkien runsaushuipun kanssa (Pakanen ym. 2016, Vatka ym. 2016), jotta ravintoa on mahdollisimman paljon saatavilla uudelle sukupolvelle. Poikaset lähtevät pesästä noin kolmen viikon ikäisenä ja vanhempien ruokinta jatkuu vielä viikon tai pari poikasten itsenäistymiseen asti. Hyönteiset ovat talitiaisen poikasten ruokavalion perusta; jopa 80% vanhempien tuomasta ravinnosta on perhosten (Lepidoptera) toukkia (Rytkönen ym. 2019).

Vastakuoriutuneen linnun iholla ja suolistossa alkaa mikrobien invaasio pesämateriaalista, vanhemmista ja ravinnosta (Ruiz-Castellano ym. 2016, Kohl ym. 2018, Teyssier ym. 2018, Dion-Phenix ym. 2021). Teyssier ym. (2018) tutkivat nuorten talitiaisten suolistomikrobiston kehittymistä ja huomasivat bakteerilajiston muuttuvan merkittävästi jo viikossa, poikasten kasvaessa seitsemän päivän ikäisistä viidentoista päivän ikään. Nuoren linnun suolistomikrobisto on vielä hyvin paljon muutoksessa ja ravinnon sisältämällä mikrobistolla saattaa olla vaikutuksia siihen, millainen bakteerilajisto kolonisoii suolen.

1.3 Mikrobiyhteisöjen metagenominen tutkimus NGS- ja 16S-tekniologialla

Mikrobiomien tutkiminen on kehittynyt valtavasti 2000-luvun aikana molekyyli­menetelmien (PCR, sekvensointi, metagenomiikka) kehittyessä, sillä vain noin kymmenesosa suolistomikrobistosta pystytään tutkimaan viljelyyn perustuvilla menetelmillä, joista ennen oltiin riippuvaisia (Knight ym. 2018). Tutkijoille on siten valjennut suolistomikrobistojen todellinen monimuotoisuus sekä mikrobiyhteisöjen valtava potentiaali ekologiassa, teknologiassa ja lääketieteessä (Anbu ym. 2013).

Sekvensointi tarkoittaa biologisessa tutkimuksessa makromolekyylien (proteiini tai nukleiinihappo) osasten järjestyksen selvittämistä. DNA:n kohdalla tämä tarkoittaa geneettisen koodin, eli nukleotidien järjestyksen kartoittamista, josta saadaan paljon tietoa esimerkiksi elion aineenvaihdunnasta ja evoluutiosta. NGS (New generation sequencing) on ensimmäisen laajasti käytetyn sekvensointitekniologian, Sangerin (1986), jälkeen kehittyneiden sekvensointitekniologioiden kirjo, jotka ovat tarkempia ja tehokkaampia kuin edeltäjänsä. Yksi näistä NGS-tekniologian kehittäjistä ja tarjoajista on Illumina, jonka sekvensointitekniologioiden perhe on saavuttanut johtavan aseman geneettisen tutkimuksen teossa kustannustehokkuutensa ansiosta. Illumina MiSeq on markkerigeenidataan erikoistunut amplikonisekvensointitekniologia, joka on käytössä erityisesti mikrobiologisissa tutkimuksissa.

Markkerigeenit, kuten 18S (aitotumallisilla) ja 16S (esitumallisilla), ovat kustannustehokas ja informatiivinen tapa määrittää näytemateriaalin eliölajistoa. 16S-geeni on esitumallisten eliöiden ribosomaalista RNA:ta koodaava geeni, joka tuottaa ribosomin pienempään puolikkaaseen (30S) tarvittavan rakennepalasen, 16S-RNA-molekyylin (16S-SSU-RNA). Geeni on elintärkeä, joten jokaisella mikrobilla on muunnelma tästä geenistä. Koko 16S-geeni on noin 1500 emäsparia pitkä ja se sisältää yhdeksän nukleotidisekvenssiltään vaihtelevaan (nk. hypervariabelia) aluetta: V1-V9. Osa näistä alueista muuntelee vähemmän (konservoitunut alue) ja osa enemmän, geenin toimintakyvyn sallimissa rajoissa. Tämä yhdistelmä vanhaa ja uutta antaa hyvät mahdollisuudet arvioida tunnistaa lajeja ja lajien välisiä suhteita. Erityisesti mikrobiyhteisöjen lajikoostumusta on suhteellisen helppo tutkia sekvensointiin perustuvalla 16S-menetelmällä. Tässä Pro gradussa keskityn geenin yhdeksästä osasta kolmanteen (V3) ja neljänteen (V4) alueeseen. Sekvensoinnin tuottamaa sekvenssidataa analysoidaan bioinformatiivisin menetelmin.

Mikrobiyhteisöjen tutkimuksen noustessa tutkimusalana, ja sekvenssidatan käytön lisääntyessä on kehitelty uusia menetelmiä ja ohjelmistoja, joilla suuria määriä dataa voi käsitellä (Plummer ym. 2015). Esimerkiksi QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Bolyen ym. 2019) on 16S-sekvenssidatalle suunniteltu bioinfo ohjelmistopaketti, jonka avulla voi muokata ja analysoida sekvensoitua materiaalia. QIIME2 sisältää sekvenssien laaduntarkkailuun ja muokkaamiseen käytettyjä ohjelmia sekä sekvensseistä luotavien taksonomioiden, fylogenioiden ja diversiteettianalyysien tekemiseen ja visualisointiin tarvittavat työkalut. QIIME2 on mikrobiologien paljon käyttämä paketti, joka valikoitui myös tämän tutkimuksen tekoon suhteellisen helpon käytettävyytensä ja monipuolisuutensa ansiosta.

Tutkimustiedon karttuessa sekvenssidataa on varastoitu kansallisiin ja kansainvälisiin tietokantoihin, kuten NCBI (National Center for Biotechnology Information) ja SILVA (Quast ym. 2013), joissa olevan datan avulla voi esimerkiksi annotoida (tunnistaa) omia sekvenssejään (Knight ym. 2018). QIIME2:lla käytettävä RESCRIPT-paketti (Robeson ym. 2020) käyttää SILVA-tietokannan koottuja sekvenssidatapaketteja mallina RESCRIPTI:n tekoälylle, joka vertaa tutkijan omia sekvenssejä tietokannan sisältöön, tunnistuen näin tutkittavien sekvenssien bakteerilajit. Näytemateriaalin bakteerilajistoja voidaan vertailla monenlaisilla diversiteettiä mittaavilla testeillä.

1.4 Tutkimuskysymykset & hypoteesit

Mikrobien kulkeutumista ravintoketjussa on tutkittu kirjallisuudessa lähes yksinomaan yhden askeleen päähän (tuottaja-herbivori). Tämä Pro gradu -tutkielma vie ravintoketjua askeleen pidemmälle, testaten bakteerien kulkeutumista kolmessa tasossa ravintoketjua (tuottaja-herbivori-peto). Tutkimukseni lähtee liikkeelle kasveista, joilla on pinnoillaan ja solukoissaan symbionttista mikrobistoa, jota päätyy kasvia syövien perhostoukkien suolistoon, kuten Hammer ym. (2017), Chaturvedi ym. (2017) ja Hannula ym. (2019) osoittivat. Tiaislintujen pesimis- ja ravinnonkäyttöä on tutkittu paljon, ja etenkin talitiainen (*Parus major*) on yleisyytensä vuoksi ekologialtaan hyvin tunnettu laji. Rytkönen ym. (2019) selvittivät, että perhostoukkien osuus linnunpoikasten ruokavaliosta kesällä on jopa 80 %, joten poikasten altistuminen toukkien sisältämälle mikrobistolle on hyvin todennäköistä.

Pro graduni pääkysymys on: kulkeutuuko mikrobeja kolme askelta ravintoketjussa: kasveista toukkien kautta talitiaisiin? Kysymystä täytyy tutkia kolmessa näyttemateriaalissa, jolloin kysymykset ovat: mitä bakteerilajeja metsäkasvien, perhostoukkien ja lintujen mikrobiomista löytyy? Löydetäänkö ravintoketjun eliöiden mikrobiomista niin paljon yhtenevyyksiä, että bakteerien välittyminen ravintoketjussa voidaan todeta mahdolliseksi? Hypotetisoin, että samoja mikrobilajeja voidaan havaita sekä kasveista, toukista että linnuista, eli mikrobeita kulkeutuisi ravintoketjussa.

Toinen gradussa käsiteltävä kysymys liittyy elinympäristön biodiversiteetin vaikutukseen tutkituilla eliöillä. Teyssier ym. (2018), Laforest-Lapointe ym. (2016) ja Hanski (2014) tutkimuksissa todettiin ihmisvaikutteisen ympäristön näkyvän myös eliöiden mikrobiomin köyhtymisenä. Näiden tutkimusten valaisemana hypotetisoin, että luonnontilaisen metsän kasveilla, perhostoukilla ja linnuilla havaitaan lajirikkaampia mikrobiyhteisöjä kuin ihmisvaikutteisessa metsässä. Tätä voidaan tutkia talitiaisten poikasten, perhostoukkien ja kasvien mikrobistoa toisiinsa vertaamalla. Pesimisympäristöistä on koottu muun muassa maaperädataa, jolla on ainakin (Hannula ym. 2019) mukaan vaikutusta kasvien mikrobistoon ja kasveja syövien toukkien mikrobistoon. Ihmisvaikutusta mitataan metsänkä-indeksillä, joka kertoo alueella tehdyistä hakkuista. Puuston koko ja latvuspeittävyys kertovat metsän iästä. Tutkin, korreloivatko nämä ympäristöstä kertovat muuttujat kasvilajien, toukkien ja linnunpoikasten mikrobistossa havaittavien variaatioiden kanssa.

Tämän Pro gradu -tutkielman tuloksia voidaan verrata aikaisempiin tutkimuksiin talitiaisten suolistomikrobiston suhteen (Teyssier ym. 2018) ja kasvien mikrobiston siirtymistä perhostoukkiin (Hammer ym. 2017, Chaturvedi ym. 2017, Hannula ym. 2020). Sinitiaisen ravintoketjun mikrobistoa tutkiva artikkeli (Dion-Phenix ym. 2021) vertasivat tammenlehtien, tammenlehtiä syövien perhostoukkien ja sinitiaisten mikrobistoa. Tämä systeemi on hyvin samanlainen kuin ensimmäinen tutkimuskysymykseni, joten siitä otettiin mallia etenkin analyysivaiheessa.

2 Materiaalit & menetelmät

2.1 Tutkimusasetelma

Idea ravintoketjun tutkimukseen lähti Hammer ym. (2017) artikkelista, jossa todettiin perhostoukkien mikrobiomin tulevan niiden ravintokasveista, eli ensimmäisen mikrobeja tutkivan linkin ravintoketjussa. Oulun yliopiston Ekologian ja genetiikan laitoksen ”Tiaisryhmän” (Rytönen & Krams 2003, Rytönen ym. 2019) kokemus ja tutkimukset tiaislintujen ekologiasta Pohjois-Pohjanmaalla mahdollistivat perhostoukkia syövien petojen tutkimisen, jolloin ravintoketju saadaan kolmelle tasolle. Tiaisryhmällä on käytössään vuosikymmeniä tutkimuksissa käytetty tiaislintujen pesäpönttöverkosto, joten koealue tutkimukseen oli valmiina. Eläinten mikrobistoa tutkittaessa ensimmäinen näyte otetaan yleensä ulosteesta, sillä siitä saatava mikrobisto kertoo paljon eliön ravinnosta, sopeumista ja interaktiosta ympäristönsä kanssa. Tutkimusasetelma järjestettiin niin, että koesysteemiin, jossa Tiaisryhmä keräsi omien tutkimustensa sivussa ulostenäytteitä noin 20 pöntön poikasilta, minkä jälkeen keräsin samojen pesien ympäristöstä perhostoukkia ja näytteitä pesäympäristön kasvillisuuden valtalajeista, jotta ravintoketjun ja elinympäristön mikrobisto tulee edustetuksi. Pesät valittiin niin, että ne edustivat sekä (lähes) luonnontilaisia että metsätalouden muokkaamia biotooppeja. Luonnontilaisiksi tulkittiin alueet, joissa metsä oli varttunutta tai vanhaa, kasvillisuus monikerroksellista ja mahdolliset merkit aiemmista hakkuista hyvin vanhoja (yleensä maatuneita kantoja). Pesät, jotka luokiteltiin sijaitsevan metsätalouden muokkaamassa ympäristössä, olivat yleensä avohakkuiden lähistöllä tai juuri harvennetuissa metsissä.

2.2 Kenttätyöt

Kasvi, hyönteis- ja ulostenäytteet tiaisten poikasilta kerättiin kesällä 2018 kesä-heinäkuun aikana Oulun (65°08’N, 25°53’E) alueelta, pääasiassa Oinaansuon, Liikasenperän, Kalikkakan-kaan ja Ruskon alueilta. Keräsin hyönteis- ja kasvinäytteet viikon kuluessa ulostenäytteen ottamisesta. Tämän katsottiin olevan hyväksyttävä aikaikkuna kasvillisuuden ja hyönteisyhteisöjen esiintyvyydessä tapahtuvien muutoksien kannalta ja riittävä säävara. Keräsin ympäristönäytteet sadepäiviä välttämällä, kello 10-22 välisenä aikana. Katsoin tässä aikaikkunassa hyönteisten olevan aktiivisimmillaan ja ylimääräisen kosteuden häiritsevän hyönteishaavia mahdollisimman vähän.

Tiaisryhmä keräsi ulostenäytteet (n = 25) Tiaisryhmän tutkimuspöntöistä 14 vrk ikäisiltä poikasilta. Ulostenäytteet kerättiin steriileihin näyteputkiin, joko suoraan linnusta tai ensiksi steriililtä muovialustalta (muovipussi) kerättynä ja säilöttiin -20 °C. Tiaisryhmäläiset saivat kerättyä keskimäärin 0,6 grammaa ulostetta per pönttö, riippuen moneltako poikaselta (1–3) saatiin näyte.

Keräsin hyönteisnäytteet (n = 24) haavimalla kenttäkerrosta ja lehvistöä noin kahden metrin korkeudelle asti. Puhdistin haavin etanolisuihkepullolla ennen jokaista näytealuetta. Kymmenellä ensimmäisellä alueella kokeilin myös karisteluhaavia, mutta menetelmä hylättiin laihan saaliin takia. Keräsin hyönteisiä 50 metrin säteeltä pesäpöntöstä, joten haavitun alueen pinta-ala oli noin 0,8 hehtaaria. Käytin haavimiseen 60 minuuttia per näytealue. Käytin desinfioitua karisteluhaavia alustana, josta poimia napatut toukat muun materiaalin joukosta. Siirsin toukat desinfioiduin pinsetein koeputkeen ja punnitsin putkien sisällön ennen pakastusta; keskimääräinen toukkasaalis painoi 1,2 grammaa. Putket pakastettiin -20 °C.

Keräsin kasvinäytteet (n = 121) samalla reissulla hyönteisnäytteiden oton kanssa. Keräsin sekä kenttäkerroksen että puuston kasvien lehtiä tai neulasia muutaman gramman Minigrip-pussiin käsin, steriilein kumihansikkain. Joka kasvilajin lehtiä kerättiin omaan pussiinsa. Kasvilajien välillä kädet desinfioitiin etanolilla tai hanskat vaihdettiin. Kasvinäytteet säilöttiin -20 °C.

Kirjasin näytteidenottopäivämäärän, pöntön sijainnin ja näytealueiden metsien pääpiirteet ylös MIMARKS (the minimum information about a marker gene sequence) -metadavaatimuksia (Yilmaz ym. 2011 mukailten: oliko pesäpaikka metsätalouden muokkaamaa vai (lähes) luonnontilaista metsää, kasvillisuuden päälaajit ja tarkempi kuvaus ihmisen vaikutuksesta (avohakkuu yms.). Näiden tietojen lisäksi Tiaisryhmä toimitti tutkimuspöntöiltä tarkemmat ympäristökuvaukset maaperästä, puuston iästä, kuutiotilavuudesta, latvuspeittävydestä sekä lähialueen hakkuista ja harvennuksista kertovan metsänkä-indeksin.

2.3 Molekyyli menetelmät

2.3.1 DNA eristys

Uloste

Eristettiin lintujen ulosteen DNA PureLink Microbiome DNA Purification Kitillä manuaalin (liite 1) mukaan, 0,1 g ulostetta/eristys. Ulosteen punnitus tapahtui analysivaalla, puhtaita bakteeriviljelytikkuja apuna käyttäen. Puhdistin työtasot ja putkitelineet etanolilla ennen työtä ja

työn jälkeen. Tein kitin reagensseista negatiivisen kontrollieristyksen veteen. Tein kaikki mahdolliset vaiheet vetokaapissa jäähauteella. Tarkistin eristetyn DNA:n laadun NanoDrop-laitteella ja säilöin näytteet -20 °C.

Perhostoukat

Siirsin toukat vetokaapissa homogenisointia varten 3 ml pyöreäpohjaisiin homogenisointiputkiin. Lisäsin putkiin 3 mm teräskuulan ja näytteitä sekoitettiin Qiagenin TissueLyser -laitteella 2min 30hz. Siirsin homogenisoidun toukkamateriaalin takaisin keräysputkiin. Sumutin kaikki työtasot ja putkitelineet etanolilla ennen työtä ja työn jälkeen. Eristin toukkanäytteistä DNA:ta M&N Nucleospin DNA Insect -mikrobiomikitillä käyttöohjeiden mukaisesti, mutta sen tuottama DNA ei kopioitunut PCR-reaktiossa. Eristin hyönteisnäytteet (30 mg) uudelleen ulosteiden eristykseen käytetyllä PureLink Microbiome DNA Purification Kitillä (Liite1). Punnitsin näytteet vetokaapissa analyysivaa'alla, puhtaita viljelytikkuja apuna käyttäen. PureLink-kitillä tuli NanoDropilla tarkistettuna puhtaampaa DNA:ta paremmissa pitoisuuksissa ja toimiva PCR-reaktio. Tein kitin reagensseista negatiivisen kontrollieristyksen veteen. Eristetty DNA pakastettiin -20 °C.

Kasvit

Punnitsin maastossa kerätystä kasvinäytepusseista vetokaapissa tarkkuusvaa'alla gramman kasvimateriaalia pienempään minigrip-pussiin, josta punnitsin steriiliin Eppendorf -putkeen DNA-eristyksen vaatiman määrän mahdollisimman terveeseen ja vahingoittumattomaan näköistä kasvimateriaalia (50 mg). En pystynyt tekemään punnitusta vetokaapissa, joten tein sen pöytätasolla, etanolilla puhdistetulla analyysivaa'alla. Käytin kasvimateriaalin käsittelyyn steriilejä pinsettejä, jotka puhdistettiin etanolissa ja liekillä joka näytteen välillä. Kasvimateriaalin ja eristetyn DNA:n käsittely tapahtui mahdollisimman paljon jäähauteella. DNA-eristykseen käytetty kitti oli QIAGEN DNeasy Power Plant Pro kit, jonka manuaalin mukaan (Liite 2)) tein kasvinäytteiden eristykset. Homogenisoitin kasvinäytteet 3 ml homogenisointiputkissa (1 kpl 3 mm teräskuula, 3kpl 1 mm teräskuula) Qiagenin TissueLyser -laitteella täydellä teholla 30 hz 2 min. Käytin mustikkaan (*Vaccinium m.*), puolukkaan (*Vaccinium v.*), kanervaan (*Calluna sp.*) ja koivuun (*Betula sp.*) Phenolic Separation Solution, ja enemmän (250 µl) IR-liuosta, sillä kyseiset kasvit sisältävät runsaasti DNA:n laatua laskevia yhdisteitä. Tein DNA:n eluution kahdessa osassa, 2x 50 µl ja tarkistin DNA:n laadun NanoDrop -laitteella. Mikäli havaitsin

eluoidussa DNA:ssa runsaasti väriä tai NanoDrop tulokset olivat liian huonot, eristin kyseinen kasvi uudelleen. Tein kitin reagensseista negatiivisen kontrollieristysten veteen. Eristetty DNA pakastettiin -20 °C.

2.3.2 PCR & Sekvensointi

Käytin kaikkiin näytteisiin 16s(PE) alukkeita (Klindworth ym. 2013) Forward = (S-D-Bact-0341-b-S-17, 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', Reverse= S-D-Bact-0785-a-A-21, 5'-GACTACHVGGG-TATCTAATCC-3'. Alukkeet monistavat 16S-geenin V3- ja V4-alueita positioiden 341F ja 805R väliltä (464 bp). Käyttöni suositeltiin alukkeita, joihin oli liitetty valmiiksi sekvensointiadapterit Illumina MiSeq -alustalle:

F= 5' - ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTACGGGNGGCWGCAG - 3'

R= 5' - AGACGTGTGCTCTCCGATCTGACTACHVGGGTATCTAATCC - 3'

Alukkeiden PCR-reaktion ligaatiovaiheen oletuslämpö 64°C toimi odotettua huonommin, joten optimoin lämpötilan omille näytteilleni sopivaksi. Kaikille kolmelle näytemateriaalille (uloste, toukat, kasvit) ligaatiolämpö 62,5 °C toimi parhaiten, joten käytin sitä varsinaisen tutkimuksen reaktiossa (Liite 3). Jokaisessa PCR-ajossa oli mukana negatiivinen kontrolli kontaminaatioiden havaitsemiseksi. Testasin PCR-reaktioiden onnistumisen agarosigeelielektroforeesilla (1 % agar, 0,05 % etiumbromidi, 80 V, 45 min); mikäli geelillä näkyi muita kopioituneita DNA-vyöhykkeitä (kontaminaatio) kuin PCR-tuote, tein näytteen reaktion uudelleen. Uloste- ja toukka-DNA kopioituivat protokolan mukaisilla pitoisuuksilla (Liite3), mutta jouduin laimentamaan joidenkin kasvinäytteiden (koivu, lakka, mustikka) DNA:ta veteen (Invitrogen Nuclease free water) suhteessa ½, 1/3 tai 1/10, jotta sain reaktion toimimaan. Syynä lienee DNA:han jääneet kasviyhdisteet. Muutaman kasvinäytteen DNA ei kopioitunut PCR:llä lukuisista yrityksistä ja templaatti-DNA:n uudelleeneristämisestä huolimatta, joten kyseiset näytteet (n=2) karsiutuivat pois tutkimuksesta. Kontrolli-DNA-eristyksistä tehtiin myös PCR-reaktiot ja lähetettiin 96-kuoppalevyllä näytteiden mukana sekvensoitavaksi.

Näytteet (n = 171, 168 näytettä + 3 kontrollia) lähetettiin Helsinkiin MiSeq-sekvensointiin Biomedicum Functional Genomics Unit:iin (FuGU) joka toimii Helsinki Institute of Life Science (HiLIFE) alaisuudessa ja yhteistyössä Biocenter Finland (BF) kanssa.

2.4 Bioinformatiikka

10 näytteen sekvensointi ilmeisesti epäonnistui, sillä niiden sekvenssejä ei löytynyt FuGu:lta saadussa tiedostossa. Bioinformatiikka suoritettiin CSC-ympäristöön ladatulla QIIME2-ohjelmistopakettilla (QIIME2.2020.8) (Bolyen ym. 2019). Alukkeiden trimmauksen jälkeen jäi 12233404 readia, keskimäärin 75000 readiä per näyte. Reverse-readit olivat huonon laatuista, joten Dada2-trimmauksessa readeja piti leikata paljon (forward left = 10, len = 160; reverse left = 3 5, len = 140). Trimmauksen jälkeen readien määrä oli 80,389, joista luotujen OTU:jen (operational taxonomical unit), 428kpl, keskimääräinen pituus oli 182 bp.

Seuraavaksi kalibroin QIIME:lle RESCRIPT-lisäosan (Robeson ym. 2020), joka käyttää SILVA-tietokannan (Quast ym. 2013) referenssisekvenssejä (versio 132) mallinaan ja tunnistaa näyttemateriaalin OTU:jen bakteerilajiston. Tällä ohjelmalla saadaan selville myös ei-haluttujen sekvenssien identiteetti, kuten mitokondrio- ja kloroplastisekvenssit, jotka ovat yleisiä sivutuotteita 16S-datassa. Mitokondrio- ja kloroplasti-OTU:jen poiston jälkeen jäi jäljelle 11,919 readiä, joista koostetui 119 OTUA. OTU:t kattoivat 161 näytteestäni vain 63. Tein Dada2-trimmauksen uudelleen (f: len = 200, r: len = 170) saadakseni pidempiä sekvenssejä ja mahdollisesti enemmän näytekattavuutta. Mitokondrioiden ja kloroplastien karsinnan jälkeen lähes kaikki ulostenäytteet ja puolet toukkanäytteet jäivät edustetuiksi, mutta ei juuri lainkaan kasveja. Yhdistin lyhemmillä ja pidemmällä readeilla tehdyt kansiot, jolloin saatiin paras mahdollinen kattavuus sekä kasveista että eläinnäytteistä: 81 näytettä, 173 OTU:a, 16250 readiä. Kontrollinäytteet (n=3) karsiutuivat pois mitokondrioiden ja kloroplastien poistovaiheessa.

Seuraavaksi laskettiin QIIME:ssä alfa- ja beta-diversiteettejä varten perusarvoja (coremetrics). Sekvenssien rarifointisyvyudeksi (rarefraction) valittiin 50, sillä tarvittiin matala arvo mahdollisimman monen näytteen säilyttämiseksi. Rarifointi arvolla 100 karsi jo lähes kaikki uloste- ja toukkanäytteet. Alfa-diversiteettin arvoista tehtiin fylogenia, joka muokattiin R-ohjelmaan kanssa yhteensopivaksi. Näytteiden mikrobidiversiteetti oli niin pieni, että Beta-diversiteettiä mittaavat komennot eivät onnistuneet lukuisista yrityksistä huolimatta.

QIIME2:ta haettua OTU-, ja fylogeniadataa analysoitiin R Commanderilla. Niistä tutkittiin alfa-diversiteettiä kvantitatiivisesti mittaava Shannonin indeksi, NMDS2-tyypin ei-metrisiä moniulotteisia skaalauksia sekä pääkomponenttianalyysi metadatan ympäristömuuttujien yhteydestä eliöiden mikrobidiversiteettiin.

3 Tulokset

3.1 Mikrobiomien koostumus

Sekvenssidatasta jäi jäljelle 50 annotoitua OTU:a, joista 13 annotoitiin lajitasolle, 39 sukutasolle ja 47 heimotasolle. Tilastollisissa testeissä käytettiin tarkinta mahdollista annotaatiota, mutta kuvailen bakteeritaksonit vain kunta (Phylum) tasolla, sillä esimerkkitutkimukseni Teysier ym. (2018) ja Dion-Phenix ym. (2021) kuvaavat bakteeritaksoninsa kuntatasolle. QIIME2-ohjelmasta saadussa pylväsdiagrammissa (kuva 1) taksonit on kuvattu pääjaksotasolle lisäinformaatiota antamaan.

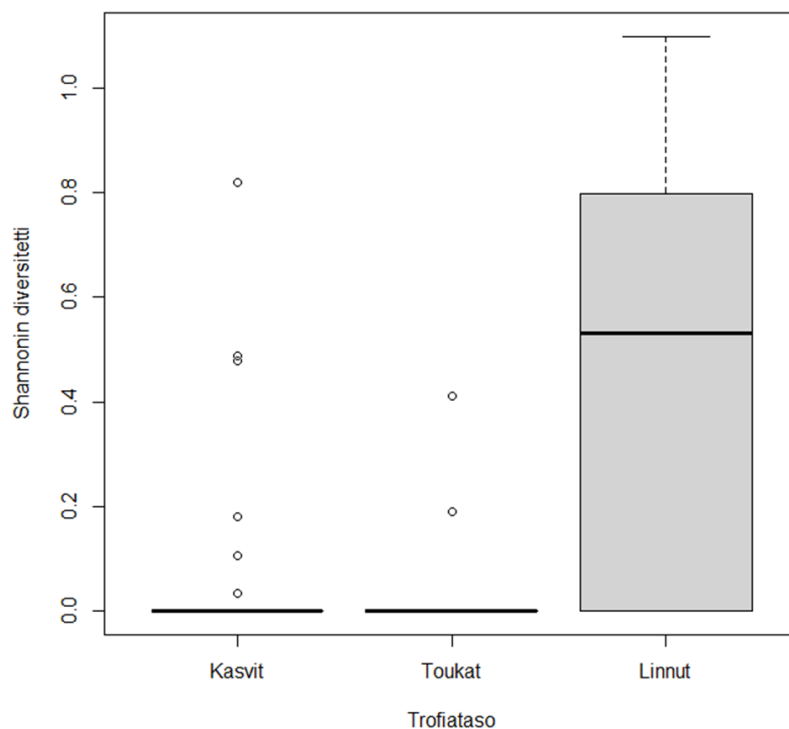
Koivun (*Betula* sp.), puna-ailakin (*Silene dioica*), pihlajan (*Sorbus* sp.), raatteen (*Menyanthes trifoliata*), suopursun (*Rhododendron tomentosum*), lakan (*Rubus chamaemorus*) ja mustikan (*Vaccinium myrtillus*) sekvenssit määrittivät ainoastaan domeenin (Bacteria) tasolle. Puolukka (*Vaccinium vitis-idaea*) mikrobisto koostui myös suurimmilta osin Bacteria-tasolle määritellyistä sekvensseistä, mutta seassa oli pieni määrä 0,5-4 % aktinobakteereja (Actinobacteria). Lieko (*Lycopodium* sp.) ja heinät (*Poaceae* sp.) koostuivat myös valtaosin Bacteria-domeenille jääneistä sekvensseistä, mutta niiden joukossa oli tunnistamattomaksi jääneitä (Unassigned) sekvenssejä 15-70 %. Männyllä (*Pinus sylvestris*) oli myös tunnistamattomia sekvenssejä, mutta mielenkiintoisena taksonina syanobakteerit (Cyanobacteria) ja pieni määrä proteobakteereja (2,8 %). Paju (*Salix* sp.) mikrobistossa havaittiin syanobakteereita 39,3 % ja loput Bacteria-domeenia.

Perhostoukkien mikrobisto koostui lähes täysin (88,6 %) proteobakteereista, mutta joukossa oli Firmicutes-kuntaa jäljelle jäävä 11,4 %.

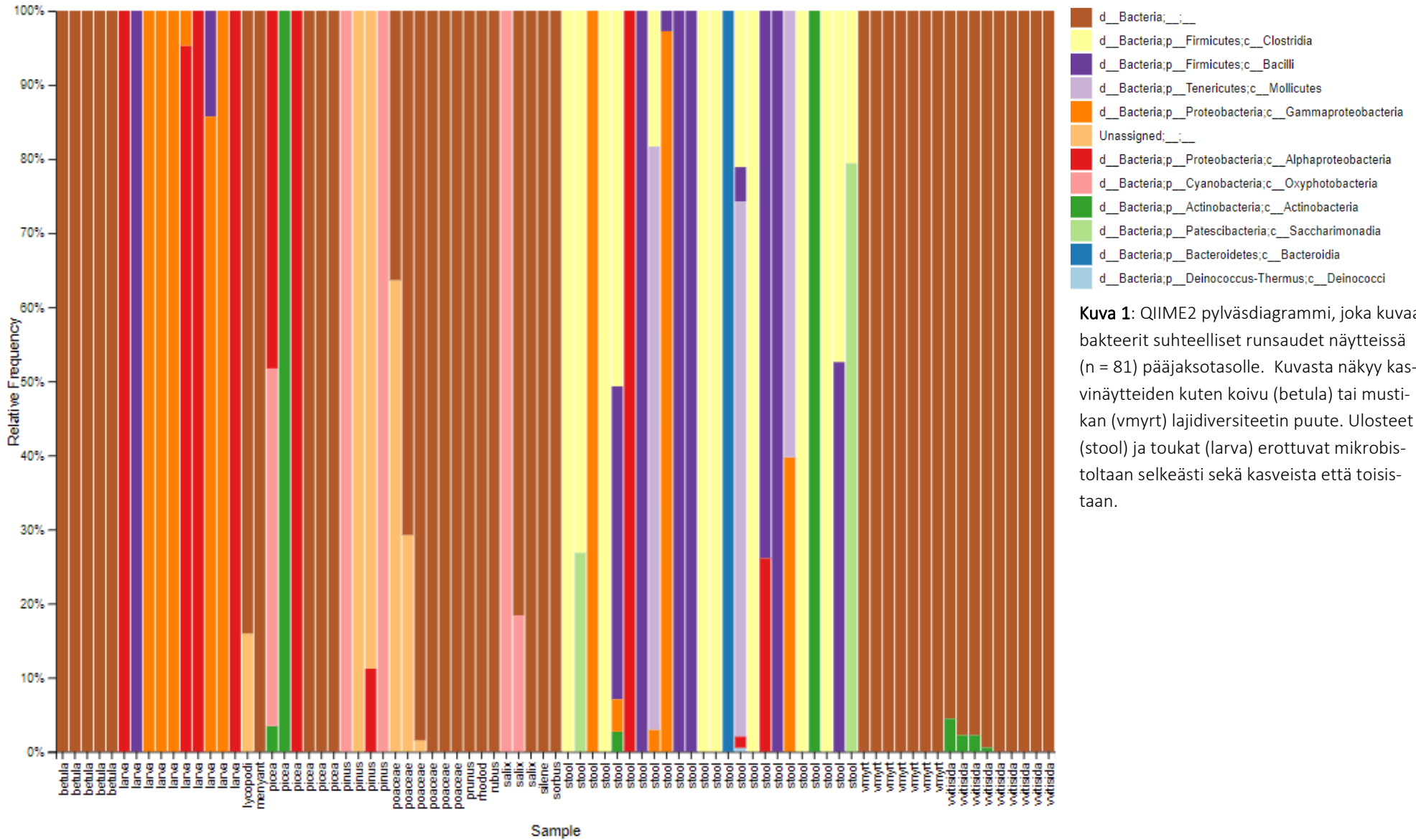
Linnunpoikasten ulostenäytteiden mikrobistosta Firmicutes edusti 62,8 %, Proteobacteria 15,48 %, Tenericutes 8,79 %, Patescibacteria 4,4 %, Actinobacteria 4,27 %, Bacteroidetes 4,16 %.

Ainoaksi yhteiseksi mikrobi-taksoniksi ravintoketjun osakkaiden välillä (Liite 4) löydettiin linnuissa ja toukissa löytynyt Proteobacteria-kunnan Alphaproteobacteria-bakteeri, joka näkyy myös kuvassa 1 punaisella. Kuvan 1 karkeampaa taksonomiaa tarkasteltaessa voisi tulkita myös violetilla värillä merkityt firmikuutit (Firmicutes) toukille ja linnuille yhteisiksi, sekä vihreät aktinobakteerit (Actinobacteria) kuuselle (picea), puolukalle (vitisisa) ja ulosteelle yhteiseksi taksoniksi, mutta tarkemmat taksonomiat kumosivat tämän (Liite 4).

Shannonin diversiteetti-indeksi (kuva 2) on yksi käytetyimpiä alfa-diversiteetin mittareita, joka ilmaisee lajiluokittelun mukaista monimuotoisuutta ottaen huomioon lajien lukumäärän ja niiden suhteelliset runsaudet. Indeksien arvo kasvaa kun näytteen lajimäärä kasvaa tai lajien suhteelliset runsaudet muuttuvat tasaisemmiksi. Toukka- ja kasvinäytteiden arvo on likimain nollassa, kertoen täysin yksipuolisesta mikrobistosta, muutaman lajirikkaamman näytteen ki- vutessa korkeammalle laatikon yläpuolelle. Lintunäytteessä puolestaan havaitaan jo suurem- paa diversiteettiä ja ero muihin näytteisiin on merkittävä ($p < 0,01$). Shannonin indeksin ja kuvan 1 silmämääräinen tarkastelu kertovat, että tutkimassani materiaalissa lintunäytteiden bakteerilajien diversiteetti on suurin.



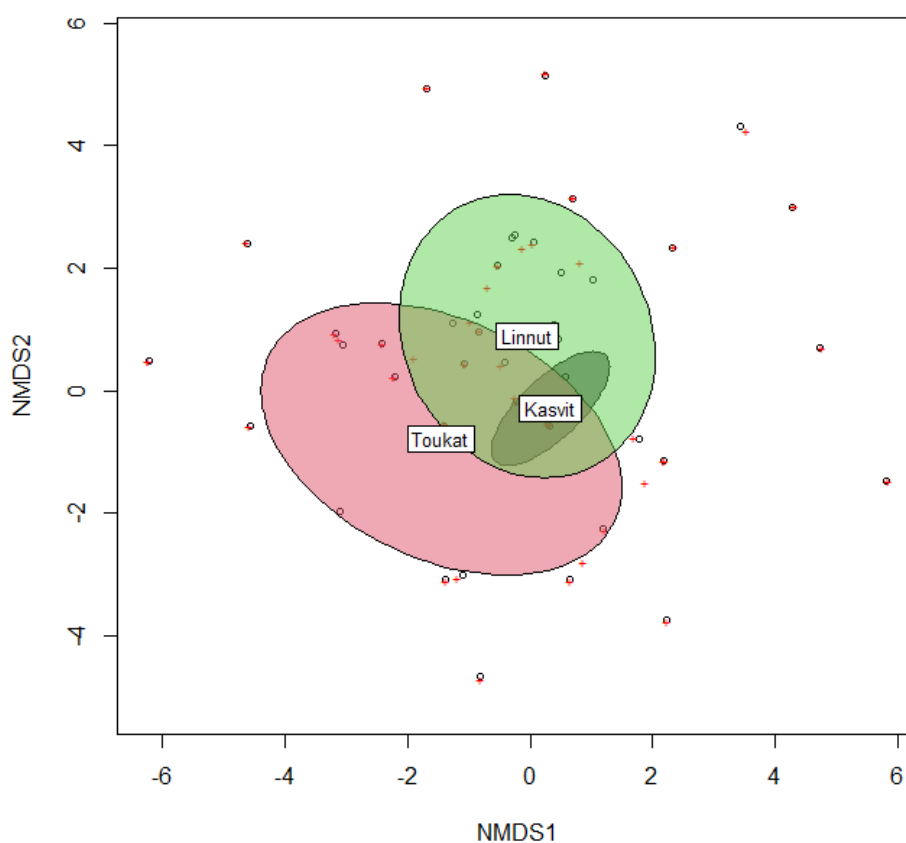
Kuva 2: Shannonin diversiteetti indeksi kasvi- toukka- ja lintunäytteiden välillä ($p < 0,01$).



Kuva 1: QIIME2 pylväsdiagrammi, joka kuvaa bakteerit suhteelliset runsaudet näytteissä (n = 81) pääjaksotasolle. Kuvasta näkyy kasvinäytteiden kuten koivu (betulla) tai mustikan (vmyrty) lajiversiteetin puute. Ulosteeet (stool) ja toukat (larva) erottuvat mikrobistoltaan selkeästi sekä kasveista että toisistaan.

3.2 Mikrobiston rakenne ravintoketjussa

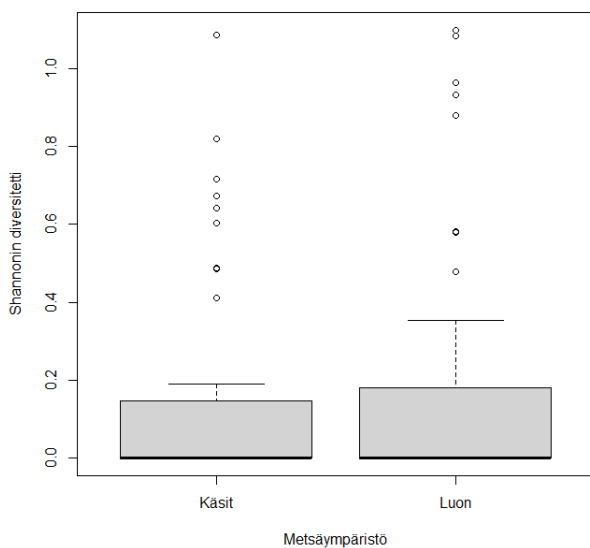
NMDS-mallinnus sijoittaa näytteet ja niiden mikrobiston kordinaatistoon. Näytteet sijoitetaan kuvaan niiden lajistollisen samankaltaisuuden perusteella ja näytepisteiden lähelle sijoittuvat lajit luonnehtivat näytteiden yhteisöä. Kuvassa 3 nähdään lintujen, perhostoukkien ja kasvien asettuminen tähän kordinaatistoon, keskimääräisen sijaintinsa ja keskihajonnan perusteella piirretyn ellipsin mukaan. Veganin 'enfit'-funktiolla tehty testi osoittaa, että nämä eri trofiatasoilla olevat näytteet eroavat lajistollisesti merkitsevästi toisistaan ($p = 0,01$). Kasvien pienen mikrobidiversiteetin johdosta ne asettuvat pieneen ellipsiin hyvin lähelle toisiaan, kun taas lintujen ja toukkien mikrobisto levittäytyy laajemmalle, osin limittäin. Toukkien mikrobistosta ei näytä muodostuvan selkeää klusteria, mutta linnuilla näytteet asettuvat suhteellisen tiiviisti keskenään.



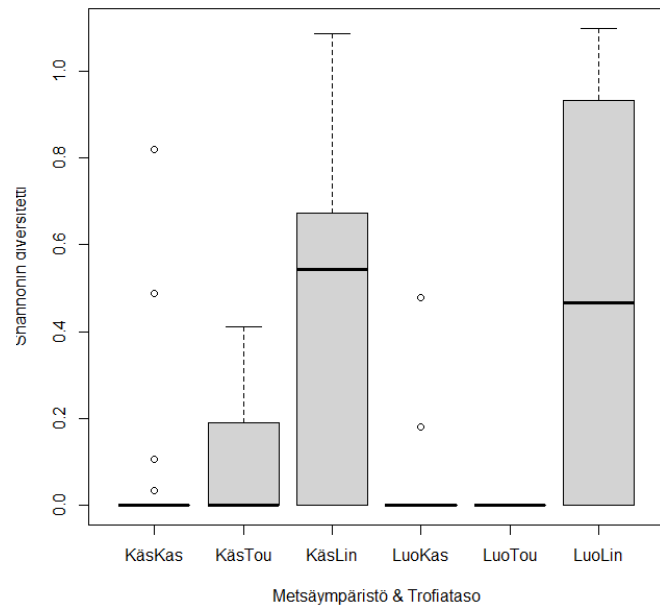
Kuva 3: NMDS2-kuvaus kasvi-, toukka- ja lintunäytteiden mikrobistosta $p = 0.01$.

3.3 Ympäristömuuttujien vaikutus mikrobiomiin

Aluksi kaikki 81 näytettä (ulosteet, toukat, kasvit) jaettiin ”luonnontilaiseen”(Luon) ja ihmisvaikutukseltaan (Käs, käsitelty) merkittävään ympäristöön; tässä jaossa ei nähty merkittävää eroa mikrobilajien diversiteetissä (Shannon: $p > 0,05$, kuva 4). Toisessa vaiheessa näytteet jaettiin trofiatason mukaan ”luonnontilaiseen” ja ihmisvaikutteiseen (kuva 5); ja tässä jaotellussa löytyi merkittäviä ($p < 0,01$) eroja. Kasvien diversiteetti on edelleen nollassa, mutta ihmisvaikutteisen ympäristön toukilla on hieman suurempi bakteeridiversiteetti kuin luonnontilaisessa ympäristössä. Mediaaniviiva on nollassa, mutta vaihteluväli ylettyy korkeammalle. Suurempi ero löytyy lintujen diversiteettiarvoista, joissa luonnontilaisten lintujen diversiteetti on hieman pienempi, joskin suuremmalla vaihteluvälillä, kuin ihmisvaikutteisen ympäristön lintujen.

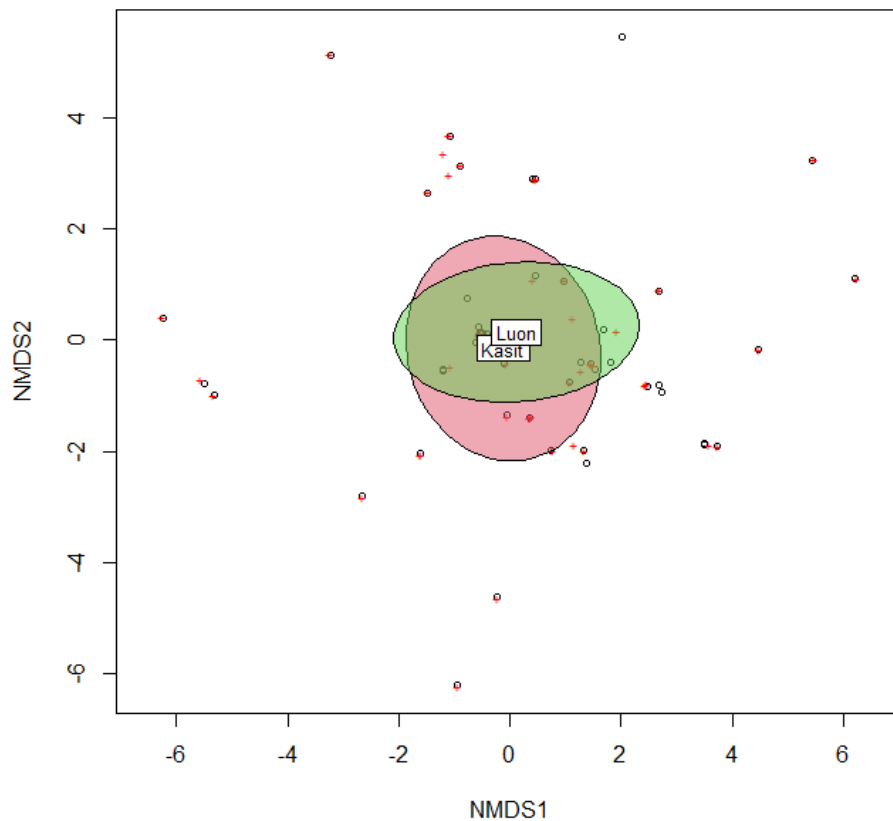


Kuva 4: Shannonin diversiteetti näytteissä, jotka kerättiin metsätalouden käsittelemistä ja luonnontilan kaltaisista ympäristöistä, trofiatasot yhdistettynä ($p > 0,05$).



Kuva 5: Shannonin diversiteetti-indeksi verrattuna luonnontilaiseen (Luo) ja ihmisvaikutteiseen (Käs) ympäristöön. Ihmisvaikutteisen ympäristön toukkien (Tou) diversiteetti vaikuttaa isommalta kuin luonnontilaisten toukkien. Vastaavasti ihmisvaikutteisen ympäristön linnuilla (Lin) mediaani osoittaa hieman suurempaa diversiteettiä, kuin luonnontilaisessa vastineessaan, $p < 0,01$.

NMDS-kuvaus osoitti, että luonnontilaisen kaltaisissa ja käsitellyissä metsissä mikrobistot olivat lajistollisesti hyvin samanlaisia (kuva 6; kun kaikki trofiatasot olivat mukana).



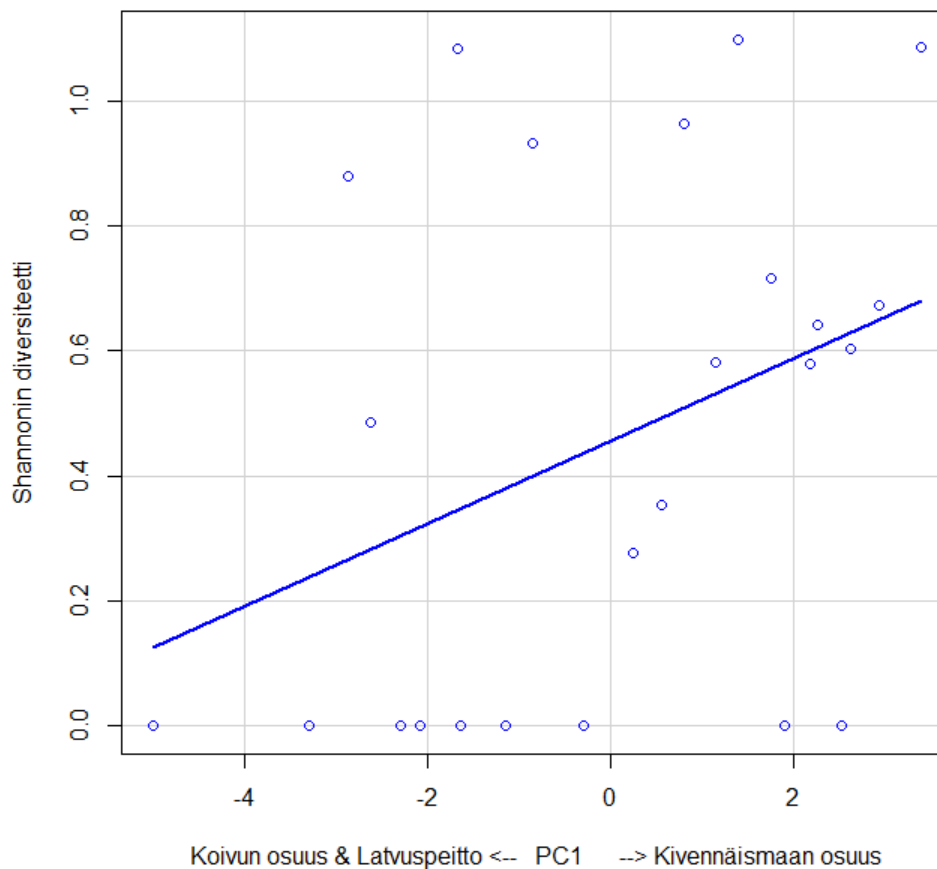
Kuva 6: NMDS-kuvaus luonnontilaisen kaltaisten ja käsiteltyjen metsien mikrobistoista, kaikki trofiatasot yhdistettynä.

Seuraavaksi testattiin pääkomponenttianalyysillä metsäympäristön muuttujien (taulukko 1) yhteyttä lintujen mikrobistoon. Tähän vaiheeseen valittiin vain lintunäytteet ($n = 24$), sillä toukkien ja kasvien bakteeridiversiteetti osoittautui jo edellisissä analyyseissä köyhiksi. Taulukossa 1 näkyy 113 ja 329 m etäisyydellä pesäpöntöstä puiden keskimääräinen ikä (ikamean), koivun, kuusen ja männyn kesimääräinen ikä (koivumean, kuusimean), puiden latvuspeittävyys (lpltvspmean), kivennäismaan osuus maaperästä (kivgrad) ja ympäristössä tapahtuneiden hakkuiden ja harvennusten indeksi, "metsankaos". Muuttujista on lihavoitu ne, jotka selittävät eniten (42,5 %) lintujen mikrobiston diversiteettiä.

Taulukko 1: Pääkomponentit

Ymp.muuttuja	PC1 (42,5 %)	PC2 (25,2 %)	PC3 (11,7 %)
ikamean113	0,0457	0,5120	0,1042
ikamean329	0,2995	0,2906	0,0666
kivgrad113mean	0,3216	-0,3048	0,2045
kivgrad329mean	0,4049	-0,0970	0,1377
koivumean113	-0,4075	0,0107	-0,1930
kuusimean113	-0,1072	0,5021	-0,1759
lpltvspmean113	-0,4091	-0,0674	-0,1677
lpltvspmean329	-0,4045	0,0133	0,0674
mantymeand113	0,1567	0,5106	0,0283
metsankaos113	0,1901	-0,1571	-0,6615
metsankasos329	0,2572	0,0679	-0,6160

Kivennäismaan osuudesta, koivun iästä ja latvuspeittävydestä piirrettiin kuvaaja (kuva5) suhteessa lintujen bakteeridiversiteettiin. Diversiteetti (Shannon) laskee koivun määrän ja latvuspeittävyden kasvaessa. Diversiteetti kasvaa kivennäismaan osuuden kasvaessa. Nämä tulokset ovat suuntaa-antavia ($p = 0,0791$).



Kuva 7: Lintujen mikrobidiversiteetin korrelaatio elinympäristön koivun määrään, latvuspeittävyteen ja kivennäismaan osuuteen.

4 Pohdinta

Mikrobiomilla, eli eliöiden kanssa vuorovaikuttava symbioottisella mikrobipopulaatiolla on merkittäviä vaikutuksia isäntäeliöön. Eliön mikrobiomiin, etenkin suolistomikrobistoon, vaikuttaa eliön ravinto ja elinympäristön biodiversiteetti. Ympäristön mikrobeja kulkeutuu etenkin ravinnon mukana eliön sisälle ja ne voivat kulkeutua eläimen läpi tekemättä mitään, mutta ne voivat myös vuorovaikuttaa eliön mikrobiomin kanssa tai jopa integroitua siihen. Mikrobien kulkeutumista ravintoketjussa on tutkittu lähinnä tuottajista kasvinsyöjiin. Tämä Pro gradu -tutkielma tutki, kulkeutuuko mikrobeja ravintoketjussa kolme askelta: kasveista perhostoukkien kautta lintuihin. Oulun alueella pesivien talitiaisten pesiltä kerättiin linnunpoikasten ulostetta sekä pesän ympäristöstä toukkia ja kasvillisuusnäytteitä. Näytteistä eristettiin mikrobialinen DNA ja siitä monistettiin mikrobien tunnistamiseen käytetty 16S-geeni. Näytteet sekvensointiin ja sekvenssidatasta analysoitiin kasvien, toukkien ja lintujen mikrobistoa sekä niiden yhtenevyyksiä.

4.1 Kasvien, toukkien ja lintujen mikrobiomi

Kasvien mikrobiyhteisöstä ei pystynyt päättelemään paljoa. Suurin osa jäi taksonomialtaan liian korkealle tasolle, mutta en poistanut niitä datasta, sillä ajattelin ajattelin OTU:jen kätkevän jonkin verran diversiteettiä jatkoanalyysijä varten. Erityistä mielenkiintoa herättävät kuudessa, männyssä ja pajussa havaitut syanobakteerit (Oxyphotobacteria). Laforest-Lapointe ym. (2016, 2017) ei havainnut puututkimuksissaan syanobakteereja, mutta niitä näkyy Hannula ym. (2019) tutkimuksessa voikukalla (*Taraxacum officinale*). Aktinobakteerit (Actinobacteria) muodostavat toisen selkeän taksonin, joka löytyi puolukasta ja kuusesta. Aktinobakteereja löytyy sekä Laforest-Lapointe ym. (2016, 2017) metsäpuista, Hannula ym (2019) voikukasta ja Dion-Phénix ym. (2021) tammenlehdistä. Aktinobakteria on äärimmäisen yleinen bakteeritaksoni maaperässä ja kasvien juuristossa vaikuttavana symbionttina (Sigh & Dubey 2018). Aktinobakteereja voi päätyä myös fyllofääriin (kasvin maanpäällisiin osiin), sillä Pro graduni kasvinäytteet otettiin reilusti maanpinnan yläpuolelta. Hannula ym. (2019) vahvistaa tämän, sillä heidän kokeissaan voikukasta irrotettujen lehtien mikrobisto ei sisältänyt yhtä paljon aktinobakteereita, kuin maassa näytteenottohetkellä kasvavan kasvin lehdet. Laforest-Lapointe ym (2016) tutkimuksessa lauhkean vyöhykkeen kasvien todettiin asuttavan samantyyppisiä bakteerilajeja, jotka muodostavat ydinmikrobiston (core microbiome). Olisi ollut

mielenkiintoista nähdä suomalaisen metsän kasveista muodostuvaa ydinmikrobistoa, joka korreloisi eri tavoin lajien ja näytealueiden suhteen.

Toukkien mikrobiomi koostui proteobakteereista (Gammaproteobacteria ja Alphaproteobacteria) ja firmikuuteista (Bacillus). Molemmat ovat yleisiä suolistomikrobiston taksoneja kautta eläinkunnan. Dion-Phénix ym. (2021), Hannula ym. (2019) ja Chaturvedi ym. (2017) perhostoukkatutkimuksissa perhostoukkien mikrobiomi koostui samanlaisesti lähinnä proteobakteereista ja Bacillus-pääluokan firmikuutesta. Tulos on hämmästyttävän identtinen kirjallisuuden verrattuna. Edellämainittujen mikrobitalaksonien universaali esiintyvyys toukkien suolistossa viittaa siihen, että ne ovat sopeutuneet hyvin perhostoukan suoliston haastaviin olosuhteisiin, vastoin Hammer ym. (2017) tutkimustuloksia, jotka viittasivat vakituisen mikrobiomin puuttuvan perhostoukilta ja mikrobiston tulevan suoraan ravintokasveista. Aiheesta käydään tulevaisuudessa vielä paljon keskustelua kirjallisuudessa, sillä tulokset ovat ristiriitaisia, arvelen itse totuuden olevan jossain kahden ääripään välimaastossa.

Linnunpoikasten ulostenäytteistä analysoitu suolistomikrobisto oli ravintoketjun trofiatasoista lajirikkain. Suolistossa on valtaosa eläimen mikrobiomista ja uloste on suora näyte eläimen suolesta, joten odotinkin sen olevan mikrobiomiltaan rikkain. Ulosteessa on myös näytemateriaalina vähiten häiriötekijöitä kasveihin (kasviyhdisteet, kloroplastit) ja homogenisoi-tuihin toukkiin (mitokondriot, toukan kudokset) verrattuna. Firmicutes (62,8 %), Proteobacteria (15,48 %) ja Tenericutes 8,79 % olivat yleisimmät bakteeritalaksonit 14 pv ikäisten linnunpoikasten ulosteessa. Teyssier ym. (2018) tulokset 15 päivän ikäisillä talitiaisen poikasilla lin-jautuvat hyvin tulokseni kanssa, ainoa iso ero on, että Teyssier ym. poikasten mikrobiomista noin kolmannes oli aktinobakteereita, mitä ei löytynyt yhtä runsain määrin omasta tutkimuk-sestani, mutta taksoni oli edustettuna (4,27 %). Linnunpoikasnäytteideni mikrobisto muistut-taa hieman enemmän Dion-Phénix ym. (2021) sinitiaisten suolistomikrobistoa, sillä niissä on edistettuna myös Bacteroidetes. Talitiaisnäytteitteni mikrobisto on kirjallisuuden perusteella validi.

4.2 Ravintoketjun mikrobisto

Tulokset eivät tukeneet hypoteesiani, että ravintoketjussa kulkeutuisi bakteereja kasveista perhostoukkien kautta lintuihin eli kolme askelta ravintoketjussa. Ainoastaan yksi lintu- ja toukkanäyte jakoivat Alphaproteobacteria -pääjakson OTU:n ja nämä näytteet eivät olleet

edes samasta pönttöympäristöstä. NMDS-analyysi näytti toukkien ja lintujen näytteiden me-
nevän osin limittäin, mikä tarkoittaa jonkinlaista samankaltaisuutta ainakin diversiteettita-
solla. Samankaltainen limittymä oli näkyvissä QIIME:llä tehdyssä kolmiulotteisessa EMPEROR-
graafissa (ei liitteenä vaikean hahmotuksen vuoksi). Dion-Phénix ym. (2021) tutki tammen,
tammaa syövien perhostoukkien ja toukkia syövien sinitiaisten ravintoketjussa siirtyvää mik-
robstoa, ja he löysivät 227 OTU:a (2,8 % OTU:jen kokonaismäärästä), jotka kaikki kolme ravin-
toketjun trofiaa jakoivat. Olisi ollut äärimmäisen mielenkiintoista saada samankaltaisia tulok-
sia, mutta suomalaisella lajistolla. Talitiainen suosii koivua ravinnonhakupuunaan ja karttaa
havupuita (Rytkönen & Krams 2003, Rytkönen ym. 2019). Koivussa on myös alkukesällä par-
haiten tarjolla perhotoukkia linnunpoikasten ravinnoksi, joten koivun mikrobiotistutus on mer-
kittävä emolinnuille ja poikasille, mutta ei näkynyt tuloksissa. Dion-Phénixin kaltainen koh-
dennettu tutkimus on tehokas, mutta halusin kartoittaa koko talitiaisen ympäristön mikrobis-
ton, en ainoastaan yhtä puulajia.

4.3 Ympäristömuuttujien vaikutus mikrobiomiin

Taksonien ollessa yhdistetty ei löytynyt merkittävää eroa ihmisvaikutteisen ja luonnontilaista
muistuttavan metsän välillä. Kun taksonit erotettiin, niin ihmisvaikutteisen ympäristön lintu-
jen bakteeridiversiteetti näytti kasvavan hieman. Tämä on mielenkiintoinen tulos, koska ole-
tuksena on, että biodiversiteetiltään pienempi ympäristö (esim. hakattu metsä, urbaani ym-
päristö) tarjoaa vähemmän ekolokeroita mikrobeille ja täten kyseisessä ympäristössä elävä
eläin kerryttää lajistoltaan köyhemmän mikrobiomin. Yksi selitys havainnolle voi olla, että häi-
rityssä ympäristössä linnun täytyy hakea ruokansa kauempaa ja täten altistuu suuremmalle
määrälle erilaisia ympäristöjä, joka voi tasoittaa mikrobikuormitusta luonnontilaisempaan
ympäristöön verrattuna. Tutkimukseni metsät olivat ”ihmisvaikutteisia” ja luonnontilaisen
kaltaisia melko pienellä erolla. Tein jaon näytteitä hakiessani ja tarkastellessani, onko met-
sässä tehty hakkuita, onko pesä urbaanissa ympäristössä tai merkittävästi ihmisen häiritsemä,
esimerkiksi keskellä peltoa. Pesäympäristöihin saataisiin suurempi ero, jos ihmisvaikutteiset
näytteet kerättäisiin urbaanista ympäristöstä, esimerkiksi keskeltä asuinalueelta. Teyssier ym.
(2018) löysi merkittäviä eroja urbaanisyyden gradientin ja lintujen mikrobiomin rikkauden vä-
liltä.

Pesäympäristöjen metadatan testaus mikrobidiversiteettiä vastaan antoi myös kiehtovan tuloksen: maaperän muuttuessa yhtenäisemmän kivennäismaan suuntaan talitiaisen mikrobisto rikastuu, ja köyhtyy, kun siirrytään koivuvaltaisempaan ja latvuspeitteeltään runsaampaan ympäristöön. Tulos on osin päinvastainen kuin olettaisi etukäteen ja tietäen talitiaisten preferenssin koivuihin ravinnonhakupuuna. Toisaalta kivennäismaan ja turvemaan ero voisi olla ekologisesti mielekäs, koska kivennäismaalla monimuotoisuus on yleensä runsaampaa. Tulos ei ollut merkittävä tilastollisesti, mutta kuvaa jotain mielenkiintoista. Tämän takia tutkimuksessa kannattaa hankkia mahdollisimman paljon dataa näytteistään; korrelaatiot voivat olla yllättäviä. Tulos olisi mielenkiintoista toisintaa suuremmalla datalla, nyt käytössäni oli vain 24 lintumikrobiston näytettä.

Biodiversiteetiltään pienemmässä ympäristössä voi olla etu pesäpaikan valinnan kannalta. Ihmisvaikutteisessa ympäristössä voi olla vähemmän patogeenejä ja petoja, jotka viihtyvät luonnontilaisessa ja rehevässä ympäristössä. Lintu voi tehdä vaihtokaupan ravinnonhakumatkan ja vaaratekijöiden välillä. O'Connor ym. (2018) julkaisussa teorisoiitiin muuttolintujen käyttävän samankaltaista tekniikkaa pesimäkaudella: linnut muuttavat eteläisiltä leveyspiireiltä pohjoisempaan, biodiversiteettigradienttia alaspäin, jotta nuoret yksilöt altistuisivat mahdollisimman vähän patogeeneille. Pro gradun näytteet otettiin 14 vrk ikäisiltä poikasilta, joten ne eivät ole liikkuneet vielä pesästään ulkomaailmaan, joten niiden luulisi edustan pesäympäristönsä mikrobistoa melko tarkasti. On mahdollista, että vanhempien mukanaan tuoma ruoka, joka täytyy kuljettaa karulle pesäpaikalle kaukaa, toimisi poikasten mikrobiomia rikastavana tekijänä; poikaset eivät itse liiku eri ympäristöissä, mutta niiden saama ravinto edustaa muita elinympäristöjä, jolloin mikrobisto olisi summa pesäpaikasta ja ravinnosta, saavuttaen korkeamman lajirikkauden kuin rehevässä ympäristössä yksinomaan elävät yksilöt.

4.4 Virhelähteet

Metagenomisessa tutkimuksessa PCR-kirjaston tekeminen on, näytteiden keruun ohella, vaikein ja virhealttiudeltaan suurin vaihe. Tutkittavia alueita täytyy monistaa tarkasti suunnitelluilla alukkeilla, jotta ne sallivat sopivan määrän variaatiota templaatti-DNA:ssa ja täten monistavat kaikkia haluttuja sekvenssejä. Kuitenkin, mitä enemmän variaatiota alukkeiden pariutumiseen sallitaan, sitä todennäköisimmin monistuu myös ei-tahdottuja sekvenssejä. Etenkin kasvien symbiontteja tutkittaessa sekvenssikirjasto sisältää aina vaihtelevan määrän klo-

roplastisekvenssejä (FT Janne Koskimäki, Oulun yliopisto, suullinen tiedonanto). Graduni sekvenssimateriaalista karkeasti kolme neljäsosaa oli mitokondriaalista tai kloroplastista alkupe-
rää. Tämä seikka yhdistettynä readieni huonoon laatuun jätti osaan näytteistä köyhän mikro-
bisekvenssien edustuksen, jos mitään. Käyttämäni alukkeet oli todettu tehokkaiksi Klindworth
ym. (2013) tutkimuksessa, mutta oman näytemateriaalini kanssa ne pariutuivat huonosti.
Tämä näkyi sekvenssien laadussa ja niistä oli vaikea annotoida OTU:ja, joiden määrä jäikin
todella pieneksi, mikä taas vaikeutti tulosten tulkittavuutta.

4.5 Johtopäätökset

Ravintoketjussa kulkeutuvia mikrobeita pystyy tutkimaan kolmella tasolla. Kasveille, perhos-
toukille ja talitiaisille saatiin määriteltyä omanlaisensa mikrobiomit, jotka olivat yhteneviä ai-
kaisempien tutkimusten kanssa. Mikrobien kulkeutumista ravintoketjussa ei pystytty toden-
tamaan. Metsänkäsittelyllä mitattuna ihmisvaikutuksella ei ollut vaikutusta tutkittuihin mik-
robistoihin, mutta metsäympäristön maaperän ja puuston laadulla näytti olevan suuntaa-an-
tava korrelaatio talitiaisten mikrobiomien lajirikkauteen.

4.6 Suositukset

Ravintoketjussa kulkeutuva mikrobisto on äärimmäisen mielenkiintoinen aihe, joka voi avata
silmiämme luonnon toiminnalle aivan uudella tavalla. Ala on melko uusi, sillä kirjallisuudessa
on tutkittu ravintoketjun mikrobistoa vain kahden tason välillä; kolmen tason tutkimuksia,
kuten tämä Pro gradu, on vain yksi Dion-Phénixin ym. (2021) tekemä tutkimus. Tutkimusalue
on siis avoinna ja täynnä mahdollisuuksia. Ravintoketju on samaan aikaan yksinkertainen,
mutta myös äärimmäisen monimutkainen systeemi, josta voi muokata lukemattoman määrän
erilaisia tutkimuksia. Tutkimusmahdollisuuksien kirjo kasvaa entisestään, jos mukaan otetaan
ympäristödataa. Hannula ym. (2019) tutkimuksessa ”kolmas” lenkki oli maaperä, josta välit-
tyvät mikrobit kolonisoivat kasvin ja siirtyivät siitä perhostoukkiin. Tällaiset lisätekijät tuovat
moniulotteisuutta tutkimukseen; kannattaa käyttää mielikuvitusta ja miettiä, mitä kulkeutu-
misreittejä mikrobeilla on. Mikrobeita on kaikkialla ja niiltä ei voi välttyä.

Eläimet kartuttavatkin iholleen ja suolistoon suuren diversiteetin symbioottisia mikrobeja ja
hyötyvät niistä. Pro gradussani ei tutkittu mikrobien toimintaa isäntäeliöissään, sillä sen kat-
sottiin olevan jatkotutkimuksen kohde. Mikrobiyhteisöjen aineenvaihduntaa voi tutkia

QIIME2:n PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) -ohjelmistopakettilla, joka tunnistaa mikrobiklaadeien biosynteesireittejä. Tällä saataisiin selville, millainen aineenvaihdunnallinen vuorovaikutus mikrobeilla on isäntänsä kanssa.

Mikrobiomitutkimuksissa keskitytään usein vain suolistoon. Kropáčková ym. (2017) havaitsivat, että mikrobisyhteisöt talitiaisen suussa ja ulostenäytteessä voivat olla hyvinkin erilaisia. Eri ruumiinosista otetut näytteet yhdistettynä mikrobien funktionaaliseen profiiliin antaisi kokonaiskuvan koko eläimen ruumiissa tapahtuvasta vuorovaikutuksesta. Suosittelen miettimään muitakin näytetyyppejä, kuin uloste.

Yksi oman tutkimukseni kompastuskivistä oli alukkeet, jotka kopioivat DNA-tani huonosti. Yksi potentiaalinen vaihtoehto jatkotutkimuksen kannalta olisi ollut Earth Microbiome Project -organisaation suosittamat 16S-alukkeet. Niillä on suuri käyttäjäkunta, vakiintuneet protokolat ja laajat tietokannat. Käytin vain yksiä universaaleja alukkeita, joiden oletettiin kopioivan kaikki haluamamme taksonit; kuvainnollisesti sanottuna kaikki munani olivat yhdessä koirissa. Suosittelen käyttämään useita alukepareja, jotka on optimoitu tiettyyn näytetyyppiin, kuten kasveille. Alukkeiden lukumäärän kasvaessa työmäärä ja kustannukset kasvavat, mutta tulokset monipuolistuvat ja varmistuvat.

Suosittelen katsomaan tutkimuskysymystä ympäröivää isompaa kuvaa ja miettimään, mitkä kaikki mahdolliset tekijät voivat vaikuttaa tutkimuksen tuloksiin.

5 Yhteenveto

Eläimille kertyy elinkaarensa aikana symbioottinen mikrobisyhteisö, jolla on merkittäviä vaikutuksia eläimen aineenvaihduntaan. Tärkeimpiä mikrobiomin lajirikkauteen vaikuttavia tekijöitä ovat eläimen kuluttama ravinto ja eläimen elinympäristö. Ravintoketjussa kulkeutuvaa mikrobistoa on tutkittu vain yhden askeleen päähän, joten testasin, siirtyykö mikrobeja kaksi askelta 3 torfiatasossa: kasveista perhostoukkiin ja perhostoukkia syöviin talitiaisiin. Tutkin myös, onko elinympäristön luonnontilaisuudella vaikutusta eliöiden mikrobiomien lajirikkauteen. Talitiaisten poikasilta kerättiin ulostenäytteitä ja pesän ympäristöstä toukkia ja kasveja, joiden mikrobistoa tutkittiin 16S-geeniin perustuvalla sekvensointimenetelmällä. Linnuilla, toukilla ja kasveilla huomattiin olevan täysin omanlaisensa mikrobisyhteisö, josta ei pystytty

todistamaan mikrobiston välittymistä ravintoketjussa. Ympäristötekijöillä havaittiin vaikutusta mikrobiomien lajirikkauteen; vastoin odotuksia ihmisvaikutteisen metsän talitiaisilla oli hieman rikkaampi mikrobiomi kuin luonnontilaisen kaltaisissa metsissä elävillä talitiaisilla. Myös koivun määrällä, latvuspeittävyydellä ja kivennäismaan osuudella elinympäristön maaperässä havaittiin viitteitä mikrobilajien määrään talitiaisilla.

6 Kiitokset

Kiitokset ensinnäkin ohjaajilleni Justus Reunaselle, Marko Mutaselle, Janne Koskimäelle ja Seppo Rytköselle. Erittäin iso kiitos myös bioinformatiikassa ohjastaneelle Kaisa Lehosmaalle.

Kiitos Justus Reunasan tutkimusryhmälle, etenkin Anna Kaisanlahdelle, Jenni Hekkalalle ja Iita Palomäelle avusta Kontinkankaan laboratoriotyöskentelyssä. Kiitokset myös Tiaisryhmän Emma Vatkalle ja Coen Westerduinille näytteiden keräämisestä ja opastuksesta tiaisten ekologiaan. Kiitokset myös Ekologian ja genetiikan laboratorihenkilökunnalle avusta.

Kiitos gradua rahoittaneille tahoille: Oulun Luonnonystävät ry, Kuopion Luonnonystävät ry:n (nykyisen Suomen Luonnosuojelusäätiön) Betty Väänäsen rahasto sekä Suomen Biologian Seura Vanamo ry.

Kiitos ystäville ja perheelle tuesta.

7 Kirjallisuus

Anbu, P., Gopinath, S. C., Cihan, A. C., & Chaulagain, B. P. (2013). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine.

Baedke, J., Fábregas-Tejeda, A., & Nieves Delgado, A. (2020). The holobiont concept before Margulis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(3), 149-155.

Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., ... & Pomp, D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18933-18938.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.

- Carthey, A. J., Blumstein, D. T., Gallagher, R. V., Tetu, S. G., & Gillings, M. R. (2020). Conserving the holobiont. *Functional Ecology*, *34*(4), 764-776.
- Chaturvedi, S., Rego, A., Lucas, L. K., & Gompert, Z. (2017). Sources of variation in the gut microbial community of *Lycaeides melissa* caterpillars. *Scientific reports*, *7*(1), 11335.
- Dion-Phénix, H., Charmantier, A., de Franceschi, C., Bourret, G., Kembel, S. W., & Réale, D. (2021). Bacterial microbiota similarity between predators and prey in a blue tit trophic network. *The ISME Journal*, *15*(4), 1098-1107.
- Frank, A., Saldierna Guzmán, J., & Shay, J. (2017). Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, *5*(4), 70.
- Gaulke, C. A., Arnold, H. K., Humphreys, I. R., Kembel, S. W., O'dwyer, J. P., & Sharpton, T. J. (2018). Ecophylogenetics clarifies the evolutionary association between mammals and their gut microbiota. *MBio*, *9*(5), e01348-18.
- Grond, K., Sandercock, B. K., Jumpponen, A., & Zeglin, L. H. (2018). The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. *Journal of avian biology*, *49*(11), e01788.
- Hammer Tobin J., Daniel H. Janzen, Winnie Hallwachs, Samuel P. Jaffe, and Noah Fierer (2017) Caterpillars lack a resident gut microbiome. PNAS 114 (36) 9641-9646 <https://doi.org/10.1073/pnas.1707186114>
- Hammer, T. J., Sanders, J. G., & Fierer, N. (2019). Not all animals need a microbiome. *FEMS microbiology letters*, *366*(10), fnz117.
- Hannula, S. E., Zhu, F., Heinen, R., & Bezemer, T. M. (2019). Foliar-feeding insects acquire microbiomes from the soil rather than the host plant. *Nature communications*, *10*(1), 1-9.
- Hanski, I. (2014). Biodiversity, microbes and human well-being. *Ethics in Science and Environmental Politics*, *14*(1), 19-25.
- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, *6*(1), 1-17.
- Hird, S. M., Carstens, B. C., Cardiff, S. W., Dittmann, D. L., & Brumfield, R. T. (2014). Sampling locality is more detectable than taxonomy or ecology in the gut microbiota of the brood-parasitic Brown-headed Cowbird (*Molothrus ater*). *PeerJ*, *2*, e321.
- Jones, A. G., Mason, C. J., Felton, G. W., & Hoover, K. (2019). Host plant and population source drive diversity of microbial gut communities in two polyphagous insects. *Scientific reports*, *9*(1), 2792.

- Junker, R. R., Loewel, C., Gross, R., Dötterl, S., Keller, A., & Blüthgen, N. (2011). Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves. *Plant Biology*, *13*(6), 918-924.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, *41*(1), e1-e1.
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., ... & Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(7), 410-422.
- Kohl, K. D., Brun, A., Bordenstein, S. R., CAVIEDES-VIDAL, E., & Karasov, W. H. (2018). Gut microbes limit growth in house sparrow nestlings (*Passer domesticus*) but not through limitations in digestive capacity. *Integrative zoology*, *13*(2), 139-151.
- Kropáčková, L., Pechmanová, H., Vinkler, M., Svobodová, J., Velová, H., Těšičký, M., ... & Kreisinger, J. (2017). Variation between the oral and faecal microbiota in a free-living passerine bird, the great tit (*Parus major*). *PLoS One*, *12*(6), e0179945.
- Laforest-Lapointe, I., Messier, C., & Kembel, S. W. (2016). Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome*, *4*(1), 27.
- Laforest-Lapointe, I., Messier, C., & Kembel, S. W. (2017). Tree leaf bacterial community structure and diversity differ along a gradient of urban intensity. *MSystems*, *2*(6), e00087-17.
- Michael S Robeson II, Devon R O'Rourke, Benjamin D Kaehler, Michal Ziemski, Matthew R Dillon, Jeffrey T Foster, Nicholas A Bokulich. (2020) RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses. bioRxiv .10.05.326504.
- O'Connor, E. A., Cornwallis, C. K., Hasselquist, D., Nilsson, J. Å., & Westerdahl, H. (2018). The evolution of immunity in relation to colonization and migration. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(5), 841-849.
- Pakanen V-M, Orell M, Vatka E, Rytkönen S, Broggi J (2016) Different Ultimate Factors Define Timing of Breeding in Two Related Species. PLoS ONE 11(9): e0162643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162643>
- Piewngam, P., Zheng, Y., Nguyen, T. H., Dickey, S. W., Joo, H. S., Villaruz, A. E., ... & Chiou, J. (2018). Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature*, *562*(7728), 532.
- Plummer, E., Twin, J., Bulach, D. M., Garland, S. M., & Tabrizi, S. N. (2015). A comparison of three bioinformatics pipelines for the analysis of preterm gut microbiota using 16S rRNA gene sequencing data. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, *8*(12), 283-291.

- Pohjanen, J., Koskimäki, J. J., & Pirttilä, A. M. (2014). Interactions of meristem-associated endophytic bacteria. In *Advances in endophytic research* (pp. 103-113). Springer, New Delhi.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. [DOI](#) *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596.
- Ruiz-Castellano, C., Tomás, G., Ruiz-Rodríguez, M., Martín-Gálvez, D., & Soler, J. J. (2016). Nest material shapes eggs bacterial environment. *PLoS One*, 11(2), e0148894.
- Ruokolainen, L., Ikonen, S., Makkonen, H., & Hanski, I. (2016). Larval growth rate is associated with the composition of the gut microbiota in the Glanville fritillary butterfly. *Oecologia*, 181(3), 895-903.
- Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Gómez-Gallego, C., Selenius, O., Salminen, S., Collado, M. C., ... & Helander, M. (2020). Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: A long-term experiment in an avian model. *Environmental Pollution*, 266, 115108.
- Rytkönen, S., & Krams, I. (2003). Does foraging behaviour explain the poor breeding success of great tits *Parus major* in northern Europe?. *Journal of Avian Biology*, 34(3), 288-297.
- Rytkönen, S., Vesterinen, E. J., Westerduin, C., Leviäkangas, T., Votka, E., Mutanen, M., ... & Orell, M. (2019). From feces to data: A metabarcoding method for analyzing consumed and available prey in a bird-insect food web. *Ecology and evolution*, 9(1), 631-639.
- Singh, R., & Dubey, A. K. (2018). Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. *Frontiers in microbiology*, 9, 1767.
- Teyssier A, Lens L, Matthysen E and White J. (2018) Dynamics of Gut Microbiota Diversity During the Early Development of an Avian Host: Evidence From a Cross-Foster Experiment. *Front. Microbiol.* 9:1524. doi: 10.3389/fmicb.2018.01524
- Teyssier, A., Rouffaer, L. O., Hudin, N. S., Strubbe, D., Matthysen, E., Lens, L., & White, J. (2018). Inside the guts of the city: Urban-induced alterations of the gut microbiota in a wild passerine. *Science of the Total Environment*, 612, 1276-1286.
- Van Nieuwerkerken, E. J., Kaila, L., Kitching, I. J., Kristensen, N. P., Lees, D. C., Minet, J., ... & Zwick, A. (2011). Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q.(Ed.) Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*, 3148(1), 212-221.Gper

- van Veelen, H. P. J., Salles, J. F., & Tieleman, B. I. (2017). Multi-level comparisons of cloacal, skin, feather and nest-associated microbiota suggest considerable influence of horizontal acquisition on the microbiota assembly of sympatric woodlarks and skylarks. *Microbiome*, 5(1), 1-17.
- Vatka E, Orell M, Rytönen S.(2016) The relevance of food peak architecture in trophic interactions. *Glob Chang Biol.*(4):1585-94. doi: 10.1111/gcb.13144.
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO (2014) The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. [Nucl. Acids Res.](#) 42:D643-D648
- Yilmaz, P., Kottmann, R., Field, D., Knight, R., Cole, J. R., Amaral-Zettler, L., ... & Glöckner, F. O. (2011). Minimum information about a marker gene sequence (MIMARKS) and minimum information about any (x) sequence (MIxS) specifications. *Nature biotechnology*, 29(5), 415-420.
- Youngblut, N. D., Reischer, G. H., Walters, W., Schuster, N., Walzer, C., Stalder, G., ... & Farnleitner, A. H. (2019). Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades. *Nature communications*, 10.

8 Liitteet

Liite 1: Ulostenäytteen kitti

PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit

Purification of high-quality microbial and host DNA from stool samples

- 1 a. Add sample and S1—Lysis buffer to the Bead Tube, according to the sample source
 - Rodent or other small animal 0.1±0.05 g, 700 µL
- b. Cap securely, then vortex.
- c. Add 100 µL of S2—Lysis Enhancer, cap securely, and vortex briefly.
- d. Incubate at 65°C for 10 minutes.
- e. Homogenize by bead beating for 10 minutes at maximum speed on the vortex mixer.
- f. Centrifuge at 14,000 × g for 5 minutes.
- g. Transfer up to 400 µL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube.
- h. Add 250 µL of S3—Cleanup Buffer, and vortex immediately. Vortex immediately to ensure even dispersion of S3—Cleanup Buffer and uniform precipitation of inhibitors.
- i. Centrifuge at 14,000 × g for 2 minutes.
- j. Transfer up to 500 µL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube, avoiding the pellet and any debris.

- 2 a. Add 900 μL of S4—Binding Buffer, and vortex briefly.
- b. Load 700 μL of the sample mixture onto a spin column-tube assembly, and centrifuge at $14,000 \times g$ for 1 minute.
- c. Discard the flowthrough and repeat step 2b with the remaining sample mixture. Ensure that the entire sample mixture has passed into the collection tube by inspecting the column. If sample remains in the column, centrifuge again at $14,000 \times g$ for 1 minute.
- 3 a. Place the spin column in a clean collection tube, add 500 μL of S5—Wash Buffer, then centrifuge the spin column-tube assembly at $14,000 \times g$ for 1 minute.
- b. Discard the flowthrough then centrifuge the spin column-tube assembly at $14,000 \times g$ for 30 seconds. The second centrifugation optimizes removal of S5—Wash Buffer, which could interfere with downstream applications.
- c. Place the spin column in a clean tube, add 100 μL of S6—Elution Buffer, then incubate at room temperature for 1 minute.
- d. Centrifuge the spin column-tube assembly at $14,000 \times g$ for 1 minute, then discard the column. The purified DNA is in the tube

The DNA is ready for immediate use. Alternatively, store the purified DNA:

- At 4°C for up to 1 week.
- At -20°C for long-term storage.

Liite 2: Kasvi-Kitti

DNeasy PowerPlant Pro Kit Handbook 05/2017

1. Add up to 50 mg of fresh plant tissue and 450 μL of Bead Solution to a 2 ml PowerBead Tube, Metal 2.38 mm (provided).

Note: If sample is high in phenolics and you are using the Phenolic Separation Solution, reduce Bead Solution to 410 μL and add 40 μL of the Phenolic Separation Solution

2. Add 50 μL of Solution SL and 3 μL of RNase A Solution and vortex briefly to mix.
3. Homogenize using PowerLyzer 24 Homogenizer.
4. Centrifuge PowerBead Tubes at $13,000 \times g$ for 2 min. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube.
5. Add 175 μL of Solution IR. Vortex for 5 s and then incubate at $2-8^{\circ}\text{C}$ for 5 min. Note: For problematic samples you can add up to 250 μL of Solution IR at this step.
6. Centrifuge at $13,000 \times g$ for 2 min. Avoiding the pellet, transfer up to 600 μL of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
7. Add 600 μL of Solution PB and 600 μL of ethanol (provided). Vortex for 5 s.
8. Load approximately 600 μL of lysate onto an MB Spin Column and centrifuge at $10,000 \times g$ for 30 s. Discard the flow-through and repeat until all the lysate has been passed through the MB Spin Column. Discard the flow-through and place the MB Spin Column back into the Collection Tube.

9. Add 500 µl of Solution CB to the MB Spin Column. Centrifuge at 10,000 x g for 30 s. Discard the flow-through and place the Spin Filter back into the same Collection Tube.
10. Add 500 µl of ethanol (provided) to the MB Spin Column. Centrifuge at 10,000 x g for 30 s. Discard flow-through and place the Spin Filter back into the same Collection Tube.
11. Centrifuge at up to 16,000 x g for 2 min. Carefully place the MB Spin Column into a new 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing ethanol the MB Spin Column.
12. Add 50–100 µl of Solution EB to the center of the white filter membrane and incubate for 2 min at room temperature.
13. Centrifuge at 10,000 x g for 30 s. For maximum elution efficiency, reload the flowthrough on to the center of the white filter membrane. Centrifuge 30 s at 10,000 x g.
14. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.

Liite 3: PCR-reaktio ja ajo

PCR-reagenssit:

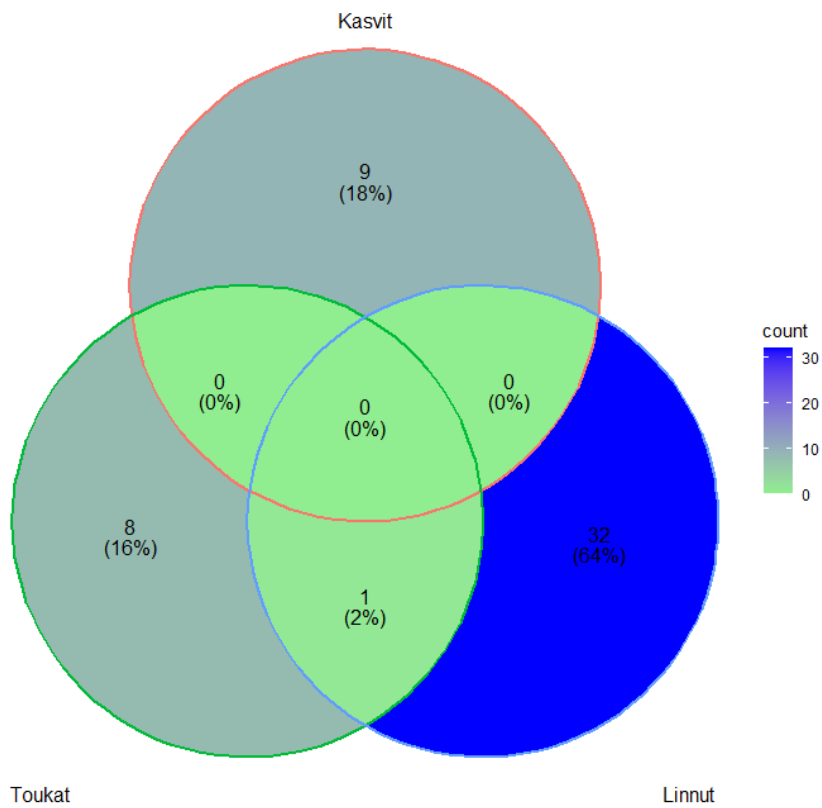
16S PCR protocol for sequencing Protocol 1

Pipetting scheme with PE adapters for Illumina:

Reagent	Final concentration	Volume (µl)
2 × Phusion High-Fidelity PCR master mix	1 ×	15
16s_F(PE) (5 µM)	0.625 µM	3.75
16s_R(PE) (5 µM)	0.625 µM	3.75
DNA		1.5
DMSO	3 %	0.9
nuclease free H ₂ O		5.1
V _{total}		30

vaihe	PCR-ajo	lämpötila	aika
1	alkudenaturaatio	98°C	1 min
2	denaturaatio	98°C	10s
3	annealing	62,5°C	30s
4	elongaatio	72°C	30s
5	loppuelongaatio	72°C	10min
6	säilytys	4°C	hold
2-4 30 sykliä			

Liite 4: Trofiatasojen mikrobistosta tehty Venn-diagrammi



Liite 4: Venn-diagrammi kasvien, toukkien ja lintujen mikrobiston yhtenevyydestä. Ainoastaan 1 mikrobitaksoni on yhteinen lintujen ja toukkien välillä.