

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Ökoloogia ja maateaduste instituut
Botaanika osakond

Sirle Varusk

**Morfoloogilisel vs. molekulaarsel meetodil mullas elavate lestade
(Acari) identifitseerimine**

Magistritöö (30 EAP)
Bioloogia ja ökoinnovatsioon

Juhendajad: Sten Anslan, *PhD* ja Kaarel Sammet, *MSc*

Tartu 2024

Infoleht

Morfoloogilisel vs. molekulaarsel meetodil mullas elavate lestade (Acari) identifitseerimine

DNA *meta*-triipkoodistamine on kiiresti arenev meetod, kus huvipakkuvate organismide määramine DNA triipkoodide põhjal pakub alternatiivi määramisele morfoloogiliste tunnuste põhjal. Antud magistritöö eesmärk on välja selgitada, kas mullaproovidest eraldatud DNA (PacBio ja Illumina sekveneerimistehnoloogiad) abil lestade koosluste määramine kattub omavahel ja morfoloogilisel teel saadud määrangute tulemustega. Kõik kolm kasutatud meetodit andsid erinevad tulemused. Enim leiti eri lestade taksoneid morfoloogilise määramise põhjal (vähemalt 103 unikaalset taksonit), OTU'sid leiti PacBio'ga 62 ja Illumina'ga 63. Liikide kattuvuste osakaal varieerub 2,3% kuni 4,6% vahel (keskmiselt 3,8%). DNA kaudu väheste lestade tuvastamine võib olla põhjustatud DNA eraldamiseks kasutatud palju väiksematest mullakogustest (2 g ja 0,2 g). Lisaks, lestade molekulaarne signaal võib olla nõrgenenud, kuna mullaproovidest eraldatud DNA amplifitseeriti universaalsete COI praimeritega. Samuti ei esinenud eri sekveneerimismeetodidel saadud taksonite määrangute vahel olulist kattuvust (18,6%). Antud tööst järeldub, et lestakoosluste uurimiseks toimis kõige paremini morfoloogiline määramine (tuvastati kõige rohkem taksoneid), kuid DNA meetodi eelisteks on võimalus tuvastada liike, mida Tullgreni aparraati kasutades ei õnnestu mullast eraldada, lisaks lestadele muid loomataksoneid samaaegselt. Kasutades eri meetodeid kombineerituna saaks antud proovi lestafaunast parima ülevaate.

Märksõnad: DNA triipkoodistamine, DNA *meta*-triipkoodistamine, PacBio, Illumina, lestad (Acari). CERCS kood: B320 Süstemaatiline botaanika, zoologia, zoogeograafia

Identifying soil-dwelling mites (Acari): morphological vs. molecular methods

DNA metabarcoding is a rapidly developing method in which the identification of organisms of interest based on DNA barcodes offers an alternative to identification based on morphological features. The aim of this master's thesis is to determine whether the identification of mite communities based on DNA extracted from soil samples (using PacBio and Illumina sequencing technologies) coincides with each other and with the result obtained using morphological identification. All three methods gave different results. The highest number of distinct mite taxa were found by morphological identification (at least 103), while using PacBio and Illumina 62 and 63 OTUs were obtained respectively. The percentage of common species to both methods varies between 2.3% and 4.6% (with an average of 3.8%). The detection of fewer mites through DNA may be attributed to a smaller amount of soil in samples used for DNA extraction (2 g and 0.2 g) and potential dilution of molecular signals due to amplification of DNA from soil samples using universal COI primers. There was no significant overlap (18.6%) between the taxonomic identifications obtained by the results of different sequencing methods. This study concludes that morphological identification worked best for studying mite communities (the most taxa were identified), however the advantages of the DNA methods include the ability to identify species that can't be extracted from soil using Tullgren funnel as well as simultaneously detecting other animal taxa besides mites. The most comprehensive overview of the mite fauna from a sample can be obtained by combining different methods.

Keywords: DNA barcoding, DNA metabarcoding, PacBio, Illumina, mites (Acari). CERCS

Code: B320 Systematic zoology, zoogeography

Sisukord

1. Sissejuhatus	4
1.1 Lestad	4
1.1.1. Sarvlestalised (Oribatida)	4
1.1.2. Imilestalised (Trombidiformes ehk Prostigmata)	5
1.1.3. Röövlestalised (Mesostigmata)	5
1.2 Lestade uurimine morfoloogilisel meetodil	6
1.3 DNA triipkoodistamine ja meta-triipkoodistamine	8
1.4. Magistritöö eesmärgid	12
2. Materjal ja metoodika	13
2.1. Proovide kogumine ja töötlus	13
2.2. DNA eraldamine ja PCR	15
2.2.1. Mullalestad	15
2.2.3 Meta-triipkoodistamine mullaproovidest	17
2.3. Andmetöötlus	18
2.4. Tööjaotus antud magistritöö valmimisel	19
3. Tulemused	19
3.1. Lestade morfoloogiline määramine	19
3.2. Lestade triipkoodistamine	20
3.3. DNA meta-triipkoodistamine	20
3.4. Lestade tuvastamine morfoloogilise vs. molekularse määramise teel	22
4. Arutelu	32
4.1. Morfoloogiline määramine	32
4.2. DNA triipkoodistamine ja meta-triipkoodistamine	33
4.3. Eri meetodite kombineeritud kasutamine	33
4.4. Tulevikuvaade	37
Kokkuvõte	37
Summary	38
Tänuõnad	39
Kasutatud kirjandus	40

1. Sissejuhatus

1.1 Lestad

Lestad (Acari) on ühed kõige mitmekesisemad ja laiemalt levinud lüljalgsed aga vaatamata sellele, puudulike taksonoomiliste teadmiste tõttu kaasatakse neid harva suuremahulistesse uuringutesse (Young et al, 2012). Lestad kuuluvad lõugtundlaliste (Chelicerata) alamhõimkonda, ämblikulaadsete klassi (Arachnida). Nad on jagatud kahte suurde monofüleetilisse gruppi: ülemselts pärislestalised (Acariformes) ja ülemselts nugilestalised (Parasitiformes). Pärislestaliste hulka kuuluvad seltsid sarvlestalised (Oribatida), imilestalised (Trombidiformes ehk Prostigmata) ning parafüleetiline Endeostigmata ja pahlestade (Eriophyoidea) ülemsugukond (Zhang et al, 2011; Pepato & Klimov, 2015; Bolton et al, 2023). Pahlesti käsitleti kuni hiljutise ajani imilestadena aga hiljutised molekulaarfülogeneetilised uuringud viitavad, et nad moodustavad omaette klaadi (Bolton et al, 2023). Nugilestalised jaotatakse omakorda neljaks seltsiks, röövlestalised (Mesostigmata), puugilised (Ixodida), Opilioacarida ja Holothyrida. Viimased kaks on vähem mitmekesised ja troopilised seltsid (Lindquist et al, 2009; Beaulieu et al, 2011). Ainult väga väikest osa lestade noorjärkudest on seni morfoloogiliselt kirjeldatud ja nad on määratavad liigini (Norton & Ermilov, 2014). Maailmas on hinnanguliselt üle miljoni lestaliigi (Stork, 2018), kuid teada on üle 55 000 liigi (Linn et al, 2024). Eestist on seni kindlaks tehtud 813 liiki (K. Sammet, avaldama andmed). Seni tuntud liikidest rohkem kui pooled elavad mullas või varises (Brussaard, 1997). Parasvõtme metsamullast võib leida ühelt ruutmeetritl miljon mulla-lesta isendit (Walter & Proctor, 2013). Lestadest toituvad paljud pinnases elavad lüljalgsed, enamasti putukad (Hoy, 2008).

1.1.1. Sarvlestalised (Oribatida)

Sarvlestad elavad enamasti maismaal kuid on teada ka mageveeliike (Schatz & Behan-Pelletier, 2008; Behan-Pelletier & Lindo, 2023). Nende teadaolevalt suurim liigiline mitmekesisus on soojadel parasvõtmealadel (Maraun et al, 2007). Mullalüljaljagsetest on sarvlestad ühed kõiged arvukamad loomad (Behan-Pelletier, 1999), nende arvukus ühel ruutmeetril metsamulla varises võib olla 500 000 isendit 100-st liigist (Schatz & Behan-Pelletier, 2008). Keskmise täiskasvanud suurus jääb enamasti vahemikku 300 µm kuni 700 µm (üldse 150 µm kuni 2000 µm)

(Behan-Pelletier & Lindo, 2023). Sarvlestadel on seitse arengustaadiumit – muna, eelvastne (munas), vastne, reeglina kolm nümfistaadiumit (protonümf, deutonümf, tritonümf) ja täiskasvanu (Klompen, 2000; Krantz & Walter, 2009; Behan-Pelletier & Lindo, 2023). Enamus neist on vabaltelavad ning toituvad surnud orgaanilisest ainest, osad toituvad seentest, vetikatest ning bakteritest (Behan-Pelletier & Lindo, 2023). Sarvlestade hulgast põlvnevad varem omaette seltsina käsitletud kõdulestaliselised (Astigmata), kelle teine nümfistaadium (nn hüpopus) ei toitu ning kolmas nümfistaadium on paljunemisvõimeline (täiskasvanuid ei esine) (OConnor, 2009). Sarvlestad on olulised lagundajad ja seeneeoste levitajad mullas (Lilleskov & Bruns 2005). Sarvlesti on maailmas teada rohkem kui 15 000 liiki (Schatz et al, 2011; Subías, 2022), Eestis on leitud 303 liiki (K.Sammet, avaldamata andmed).

1.1.2 Imilestaliselised (Trombidiformes ehk Prostigmata)

Imilestad elavad nii maismaal kui ka veekogudes (sealhulgas meres). Nad on võimelised asustama ekstreemseid keskkondi (Walter et al, 2009). Mullas on nende liigirikkust alahinnatud (Young et al, 2019). Enamus imilesta liikide suurus jääb vahemikku 0.1 kuni 16 mm (Coons & Rothschild, 2008). Neil on enamasti seitse arengustaadiumit (Walter et al, 2009). Suur osa imilesti on röövtoidulised, taime- või loomaparasitiidsed (Hernandes et al, 2015), vähem leidub saprofaage ja manulasi (Walter et al, 2009). Parasitism on korduvalt tekkinud imilestade eri klaadides (Bochkov, 2008). Mullas elavatel liikide toidust moodustuvad olulise osa ümarussid (Nematoda) (Whitford & Santos, 1980), samuti leidub liike, kes toituvad seeneniidistikust (Walter, 1988), suuremad liigid toituvad lüliljalgssetest või nende munadest (Kethley, 1990). Maailmast on teada üle 25 000 liigi (Zhang et al, 2011), Eestist on leitud 250 liiki (K.Sammet, avaldamata andmed).

1.1.3 Röövlestialised (Mesostigmata)

Röövlestad elavad mullas, varises, kõdupuidus, linnupesades, taimedel ja parasitiisena loomadel (Lindquist et al, 2009). Röövlestade liike on mullas vähem kui sarvlestade ja imilestade (Coleman et al, 2017). Röövlestade suurus jääb enamasti vahemikku 200 µm kuni 4500 µm (Lindquist et al, 2009). Röövlestadel on neli arengustaadiumit – vastne, kaks nümfistaadiumit ja täiskasvanu (Lindquist et al, 2009). Suurem enamus röövlesti on vabalt elavad kiskjad, kuid leidub ka parasiite, vähesed toituvad seentest, nektarist või õietolmust (Karg, 1993; Koehler,

1999; Lindquist et al, 2009). Mullas elavate liigid toituvad ümarussidest, lüljalgsetest ning nende munadest (Walter & Ikonen, 1989). Rõõvlesti on maailmas teada üle 11 000 liigi (Beaulieu et al, 2011), Eestist on leitud 173 liiki (K. Sammet, avaldamata andmed).

1.2 Lestade uurimine morfoloogilisel meetodil

Olenevalt sellest, mis elupaiga eelistustega taksoniga on tegemist kasutatakse lestade kogumiseks erinevaid meetodeid (Walter & Krantz, 2009). Üheks tavalisemaks mullaelustiku ekstraheerimis meetodiks (eraldamiseks mullast) on termoelektroor ehk Tullgreni aparaat (joonis 1). Sageli hoitakse proove aparaadis üks nädal või senini kuni proov on täiesti läbi kuivanud (Walter & Krantz, 2009; Coleman et al, 2017). Termoelektroori põhimõtte on järgmine – proov asetatakse termoelektroori lehtrisse, mille põhjas on hõre metallvõre. Lehtri kohal on soojust kiirgav hõõgpirn. Lehtris tekib temperatuuri ja valguse gradient, mistõttu tingimused muutuvad loomade jaoks ebasobivaks, ning nad liiguvad varju otsides allapoole kuni kukuvad lehtrist välja 95% etanooliga täidetud proovitopsi (joonis 2). Proovide lühiajaliseks säilitamiseks sobib 70% etanool. Kui on soov elus lesti ekstraheerida tuleb proovitopsi põhja etanooli asemel asetada niiske paberrätik (Krantz & Walter, 2009). Kui lehtrisse satub ka suuremaid loomi (näiteks mardikaid, vihmausse, hulkjalgseid) võib nende sagimise tõttu proovitopsi langeda peale lestade ka palju mulda (joonis 2). Tullgreni meetodi puuduseks on see, et ei õnnestu kõiki loomi ekstraheerida. Selleks, et lesti välistunnuste põhjal liigini määrata tuleb neist enamasti kõigepealt teha ajutised või püsipreparaadid. Tegemist on aeganõudva protsessiga, mille käigus lahustatakse nende pehmed koed, tagamaks parem vaadeldavus mikroskoobi all. Kõigepealt loputatakse lestad destilleeritud vees, misjärel keedetakse neid piimhappes (või hoitakse soojakapis) ning seejärel loputatakse uuesti destilleeritud vees (täpsem kirjeldus antud töö metoodika osas). Igal ühest topsist teise tõstmisel on oht kaotada väikesi, silmale pea nähtamatuid loomi. Rõõvlestade puhul on preparaadi valmistamise käigus soovitatav eemaldada nende oluliseid määramistunnuseid kandvad *subcapitulum* ja helitseerid, selle tegevuse käigus on oht lõhkuda looma liiga palju (või kaotada harjaseid) ja kahjustada seeläbi erinevaid olulisi määramistunnuseid. Püsipreparaadi tegemiseks kasutatakse Hoyeri lahust või Euparali. Oluline on ka lesta asend püsipreparaadil. Sarvlestad ja imilestad prepareeritakse jalad alla poole

suunatuna aga röövlestade puhul toimitakse vastupidi (Krantz & Walter, 2009). Sarvlestade ja imilestade morfoloogiliseks määramiseks kasutatakse ka skaneerivat elektronmikroskoopi. Lestade uurimisel morfoloogilisel meetodil esineb rida puudusi ja takistusi. Maailmas esineb eri valdkondade taksonoomide nappus (Engel et al, 2021), nii pole ka akaraloloogia erand. Kõige suuremad probleemid on suur ajakulu, vajalikud eelteadmised lestadest ja kogemust nende määramiseks (Collins & Cruickshank, 2013) ning lestade hulgas on palju kirjeldamata elujärke ja krüptilisi liike. Ainult morfoloogiliselt määrares võib tegelikku liigirikkust alahinnata (Skoracka et al, 2015). Samal ajal võime ka fenotüübilise plastilisuse tõttu pidada ühte ja sama liiki eri liigiks kuna neil on lihtsalt suur varieeruvus. On olemas liike, kelle emased ja isased on ekslikult kirjeldatud eri liikideks (Karg, 1993). Kui kõik tunnused pole hästi nähtavad või on kadunud võime looma ka valesti määrata. Morfoloogilisel meetodil saab üldjuhul määrata liigini ainult täiskasvanud isendeid, mistõttu läheb seda viisi rakendades palju olulist informatsiooni kaduma. Röövlestade isasloomade kohta puuduvad hetkel määrajad, millega saaks neid määrata liigi tasemeni, mistõttu võivad jääda ka täiskasvanud isendid määramata. Arvatavasti eelmainitud põhjustel jäetakse laiamahulistest uuringutest lestad sageli välja või määratakse ainult klassi või seltsi tasemele, samuti tööd, kus lestad on liigini määratud keskenduvad sageli konkreetsele lesta taksonile kohalikus mastaabis (Marra & Edmonds, 2005; Donoso et al, 2010; Gan et al, 2019).



Joonis 1. Töötav Tullgreni aparaat.



Joonis 2. Tullgreni aparaadi kogumistops.

1.3 DNA triipkoodistamine ja *meta*-triipkoodistamine

DNA triipkoodistamise all mõistetakse meetodit, kus isendi taksonoomilise kuuluvuse kindlakstegemiseks kasutatakse organismi DNA lühikest markerit (Hebert et al, 2003a), seega geneetiline marker on kui triipkood, mis aitab eristada taksoneid. DNA triipkoodi geen peab vastama kolmele kriteeriumile – peab esinema selge triipkoodistamistühimik (*barcoding cap*) ehk võimalikult suur liikidevaheline varieeruvus ja piisavalt väike liigisisene varieeruvus; kindel konserveerunud koht kuhu saab seonduda PCR praimer; ning selleks, et DNA eraldamine ja amplifitseerimine oleks hõlpsam ei tohiks järjestus olla liiga pikk (Hebert et al, 2003a; Kress & Erickson, 2008). Hea marker peaks esinema kõikides huvipakkuvates taksonites (Hebert et al, 2003a). Ei ole olemas ühtset markerit, mis töötaks kõikide organismide peal (Chac & Thinh, 2023), mistõttu eri organismide triipkoodistamisel kasutatakse erinevaid genoomi regioone. Prokarüootide tuvastamiseks kasutatakse põhiliselt 16S ja mikroobsete eukarüootide puhul 18S rRNA geene (Chun et al, 2007; Hadziavdic et al, 2014; Vincent et al, 2017). Seente puhul sekveneeritakse enamasti ribosoomi subühikute struktuursete RNA-de vahelist transkribeeritavat RNA lõiku ehk sisemist transkribeerivat speisserit ehk ITS-i (*Internal transcribed spacer*)

(Schoch et al, 2012; Irinyi et al, 2016). Taimede puhul on välja pakutud väga paljude erinevate geenide kasutamist (Yu et al, 2021) aga ribuloos-bisfosfaadi karboksülaas-oksügenaasi suur subühik (*rbcL*) on levinuim (Hollingsworth et al, 2009). Loomade määramisel läbi DNA triipkoodi kasutatakse kõige sagedamini ligikaudu 650 aluspaarilist mitokondri tsütokroom C oksüdaas I (COI) geeni fragmenti. Võrreldes tuuma geenidega on loomade mitokondriaalsed geenid valdaval osal haploidsed, neil puuduvad intronid ning harva esineb rekombinatsiooni, mistõttu toimub seal vähem insertioone ja deletsioone ning muid ulatuslikke ümberkorraldusi. Samuti evolutsioneerub mitokondriaalne genoom keskmiselt kiiremini kui tuumagenoom. Seetõttu saab lähedasi liike mitokondriaalse genoomi sekventsides abil paremini eristada (Hebert et al, 2003b). Mitokondriaalse DNA COI geeni põhjal on selgrootute liikidevaheliseks sekventsides erinevuskriteeriumiks pakutud 3% (Hebert et al, 2003a), kuid see pole ühtne üle kogu loomariigi (Anslan & Tedersoo, 2015; Zhang & Bu, 2022).

Triipkoodistamiseks eraldatakse ühelt organismilt või selle osalt (nt putuka jalg või koeproov) DNA. Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR, *polymerase chain reaction*) abil amplifitseeritakse huvipakkuv DNA piirkond. DNA järjestuste tuvastamiseks kasutatakse erinevaid sekveneerimise meetodeid (Vincent et al, 2017). Sangeri meetod, mis kuulub esimese põlvkonna sekveneerimismeetodite hulka, on täpne, kuid aja- ja tööjõukulukas ning võimaldab korraga sekveneerida ainult 96 sekventsi (van Dijk et al, 2014; Vincent et al, 2017). Tänapäeval on enim kasutatavad järgmise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad (NGS ehk *next generation sequencing*, sünonüüm HTS ehk *high-throughput sequencing*), mis võimaldavad genereerida oluliselt suuremal hulgal DNA järjestusi (näiteks, Illumina NovaSeq 6000 masin võimaldab genereerida sadu miljoneid sekventse). Seega, võrreldes Sangeri meetodiga on NGS oluliselt suurendanud andmehulka, efektiivsust ja rakendatavust. Järgmise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiaid saab jagada kaheks: teise põlvkonna (näiteks Illumina ja Ion Torrent) ja kolmanda põlvkonna sekveneerimine (näiteks Pacific Biosciences ja Oxford Nanopore tehnoloogiad) meetoditeks. Neil mõlemil on oma tugevad küljed ja puudused (Hu et al, 2021). Teise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiatega on võimalik sekveneerida sadu miljoneid järjestusi suhteliselt kõrge täpsusega, kuid sekveneeritavate järjestuste pikkus jääb vahemikku kuni 2x300 aluspaari. Lühikeste järjestuste tõttu võivad esineda raskused DNA

fragmentide kokkupanemisel (genoomi sekveneerimise puhul), haplotüüpide kindlakstegemisel ning trankstripi isovormide ja struktuurse varieeruvuse tuvastamisel (Hu et al, 2021). Lühike järjestus võib olla liiga lühike, et liikidel vahet teha (triipkoodistamistühimik puudub), aga pikemas sekventsisis on rohkem varieeruvust ja määramine on täpsem (Tedersoo et al, 2021). Kolmanda põlvkonna sekveneerimine võimaldab sekveneerida üle 20 kbp pikkusi järjestusi. Samuti pole takistuseks kogu genoomi hõlmavad kordused ja struktuurse varieeruvuse tuvastamine. Algselt oli kolmanda põlvkonna sekveneerimise puuduseks madalam täpsus aga see on aastate jooksul järjest paranenud (Rhoads & Au, 2015; Besser et al, 2018; Hu et al, 2021; Eisenstein, 2023; Marx, 2023). Näiteks uuemad Pacific Biosciences (lühidalt PacBio) sekveneerimismasinad suudavad genereerida kuni 20 kbp järjestusi 99,9% täpsusega (Tedersoo et al, 2021). PacBio võimaldab sekveneerida ka veelgi pikemaid järjestusi. On väidetud, et kuni 5% loetud järjestustest võivad olla pikemad kui 135 kbp (PacBio infoleht). Oxford Nanopore tehnoloogia (lühidalt ONT) kasutab valgu nanopore iseloomustamiseks läbi poori liikuva DNA ahela järjestust elektrolüütilise voolu muutuse kaudu (Schneider & Dekker, 2012; Logsdon et al, 2020). ONT võimaldab sekveneerida pikemaid fragmente, keskmise lugemi pikkusega 100 kbp 99 protsendi täpsusega (Marx, 2023). ONT sekveneerimisplatvormide hulka kuulub ka USB-toitega kaasaskantav MinION DNA sekvenaator, mida antud töös kasutati lestade triipkoodistamise protsessis. Kõrgekvaliteetseid sekveneerimisandmete tulemusi võrreldakse referentsandmebaasis olevate DNA järjestustega. Referentsandmebaas ühendab DNA triipkoodi teadusliku taksoninimetusega, paremal juhul on olemas ka vautšerisend koos metaandmetega (Weigand et al, 2019). Selleks, et organismi määramine oleks efektiivne on vaja usaldusväärseid järjestuste andmebaase antud taksoni kohta. Täpsuse tagamiseks on oluline taksonoomiline laialdane katvus ja kvaliteet. Taksonoomiline katvus on eri rühmade ja geograafiliste piirkondade lõikes väga erinev (Weigand et al, 2019). Mõned molekulaarsel määramisel ettetulevad probleemid seisnevad selles, et valitud markeri varieeruvus ei ole piisav, et eristada liike, kes on hiljuti lahknunud (Weiss et al, 2018) või kahe lähedalt suguluses oleva liigi vahel võib toimuda veel geenisiire, mistõttu triipkood on segu mõlemast (Weigand et al, 2017). Samuti esineb vigu referentsraamatukogu loomisel, näiteks morfoloogilise määramise vead, järjestuste reostus, vale andmehaldus (Weigand et al, 2019). Peamised DNA järjestuste referentsandmebaasid on *Barcode of Life Data System* (lühidalt BOLD) ja *National Center for Biotechnology Information*

(lühidalt NCBI) alla kuuluv GenBank (Ratnasingham & Hebert, 2007; Kvist, 2013). Seente ja muude eukarüootide ITS järjestuste jaoks on enim kasutatav kureeritud andmebaasiks UNITE (Kõljalg et al, 2020). BOLD sisaldab ligi 17 miljonit triipkoodi üle 350 000 liigist (*Barcode of Life Data System*, 2024). GenBank on põhjalik ja avalik geeni järjestuste andmebaas, mis sisaldab 25 triljonit aluspaari, enam kui 3,7 miljardist nukleotiidi järjestusest, mis on pärit 557 000 kirjeldatud liigist (Sayers et al, 2024). Avalik triipkoodi järjestus puudus kuni 50% liikidest osades taksonoomilistes rühmades 2019 aasta andmetel (Weigand et al, 2019). DNA triipkoodistamine on üks DNA *meta*-triipkoodistamise alusmeetodidest, luues vajaliku referents-sekvents, mida saab kasutada *meta*-triipkoodistamise töös liikide tuvastamiseks. Erinevus DNA triipkoodistamine ja DNA *meta*-triipkoodistamise vahel on see, et DNA *meta*-triipkoodistamine ei keskendu ühele konkreetsele isendile vaid selle eesmärk on määrata liigiline koosseis kogutud keskkonnaproovist (Taberlet et al, 2012). *Meta*-triipkoodistamise laboritöö toimub sarnaselt DNA triipkoodistamisega, kuid erinevalt isendist võetud proovile, võetakse keskkonnaproov (nt mullast, veest, õhust) ning sealt eraldatakse geneetiline materjal. PCR abil amplifitseeritakse spetsiifilised DNA piirkonnad ning järjestuste lugemiseks kasutatakse järgmise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiaid. Operatsiooniline taksonoomiline üksus (lühidalt OTU ehk *operational taxonomic unit*, samuti kirjanduses kasutuses MOTU molekulaar-taksonoomiline üksus ehk *molecular operational taxonomic units*) on teatud sarnasuskriteeriumi põhjal moodustatud grupp sarnaseid järjestusi. OTU'd (koos proovides esinemise sagedustabeliga) on tavaliselt bioinformaatilise analüüsi lõpp-produktiks, ning saadud OTU'de järjestusi võrreldakse referentsandmebaasis olevate andmetega, mis võimaldab tuvastada järjestuste taksonoomilise kuuluvuse (Hakimzadeh et al, 2023). *Meta*-triipkoodistamise edukus sõltub referentsjärjestuste olemasolust ja markeri valikust. Markeri pikkuse ja taksonoomilise eraldusvõime vahel esineb lõivsuhe - üldiselt pikad DNA fragmendid tagavad parema eraldusvõime aga lühemad amplifitseeruvad efektiivsemalt ning nende sekveneerimine on teise põlvkonna sekveneerimisplatvormidega odavam (Liu et al, 2020).

DNA triipkoodistamine on hetkel üks kõige tõhusamaid viise liikide tuvastamiseks. Seda on kasutatud kiireks määramiseks kohtuekspertiisis, toidu tarneahelate kontrollil ja haiguste uurimiseks (Dalton et al, 2020; Liu et al, 2021; Dawan & Ahn, 2022; Antil et al, 2023; Gorini et

al, 2023; Chac & Thinh, 2023), invasiivsete- ja võõrliikide tuvastamiseks (Comtet et al, 2015; Xu et al, 2018; Hardulak et al, 2020; Westfall et al, 2020; Niemann et al, 2022), krüptiliste liikide tuvastamiseks (Hebert et al, 2004; Brower, 2006; Brasier et al, 2016), parasiitide vaheperemeeste uurimiseks (Ondrejicka et al, 2014), taimekaitses (Floyd et al, 2010), illegaalse loomadekaubanduse tuvastamiseks (Mwale et al, 2017). Ökoloogilistes uuringutes saab DNA triipkoodistamise meetodid kasutada kui tahetakse mingit liiki tuvastada mitteinvasiivsel meetodil, näiteks läbi leitud karvade, väljaheidete ja uriini. Nii saab jälgida mingi looma areaali muutusi (nagu seda on tehtud huntide näitel) (Valière et al, 2003), või uurituda ohustatud liike, neid mitte häirides (näiteks amuuri tiiger ja amuuri leopard) (Sugimoto et al, 2006). Lesti on DNA-baasil vähe uuritud ja praegu eksisteerivad uuringud on suuresti eiranud mullas elavaid rühmi. Olemasolevad uuringud on keskendunud peamiselt puukidele, tolmulestadele ja põllumajanduse kahjuritele (Arribas et al, 2020). Selleks, et lesta DNA-d kätte saada on kasutatud nii destruktiivseid kui mittedestruktiivseid meetodeid, samuti on töid kus on kasutatud ainult ühte jalga (Young & Hebert, 2022). Geneetilised markerid, mida nende uurimiseks kasutatud, on COI (Young et al, 2021; Pérez-Sayas et al, 2022; Young & Hebert, 2022; Pflingstl et al, 2023; Santos-Perdomo et al, 2024), 18S rRNA geen (Pflingstl et al, 2023), 28S rRNA geen (Lehmitz & Decker, 2017; Kaminskienė et al, 2023) ITS1 (Pérez-Sayas et al, 2022) ja ITS2 (Ben-David et al, 2007; Pérez-Sayas et al, 2022). Praegu leidub andmebaasides lestade kohta vähe informatsiooni ning esineb palju vale määranguid (Recuero et al, 2023). Molekulaarseid meetodeid on kasutatud krüptiliste liikide tuvastamiseks (Pflingstl et al, 2019a; Pflingstl et al, 2019b; Pflingstl et al, 2023), piirikontrollis võõrliikide tuvastamiseks (Abeynayake et al, 2021), uurimaks Kanada lähisarktilises piirkonnas olevaid lesti sugukonna ja perekonna tasemini (Young et al, 2012). DNA *meta*-triipkoodistamist on kasutatud röövlestade toitumise uurimiseks (Oliveira et al, 2022) ja uurimaks kuidas sarvlestad reageerivad kõrgendatud CO₂ sisaldusele (Ross et al, 2020), ühes suuremahulises uuringus leiti, et Kanadas võib olla hinnanguliselt üle 30 000 lestaliigi, enne seda uuringut oli sealt teada alla 3000 liigi esinemisest (Young et al, 2019).

1.4. Magistritöö eesmärgid

Tänapäeval on laialdaselt kasutuses molekulaarsed meetodid kuid, enamik teadmisi pärineb morfoloogia põhjal saadud uurimustest. Huvitav oleks neid omavahel võrrelda ning välja

selgitada nende eelised ja puudused. DNA *meta*-triipkoodistamisel on väga suur potentsiaal, see võimaldab teha suuremahulisi ja globaalseid mullafauna uuringuid, seirata mullafaunat ja hinnata seal toimuvaid muutusi ajas ning koguda informatsiooni levikumustrite kohta. Käesoleva magistr töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas mullaproovidest eraldatud DNA abil lestadest koosluste määramine kattub morfoloogilisel teel määratud isendite määramistulemustega. Molekulaarseid meetodeid on erinevaid, aga kas nad annavad samu tulemusi kui sama proovi eri meetoditega uurida? Kui suur võiks olla mullakogus, et saada head tulemust (st leiaks üles ja määraks korrektselt võimalikult suure osa liikidest)? Antud töös kasutati PacBio ja Illumina sekveneerimistehnoloogiaid (2 g ja 0,2 g alamproovidest). Kahe alamproovi eesmärk ühest mullaproovist oli võrrelda tuvastatud mullalestadest hulka sõltuvalt DNA eralduse jaoks kasutatud mullakogusest. Katsetati kahte eri eralduskomplekti DNeasy PowerSoil Pro (0,2 g) ja PowerMax Soil (2 g), samuti kahte eri standarpraimer komplekti – LCO1490 ja HCO2198 (Folmer et al, 1994), ning mlCOIintF (Leray et al, 2013) ja jgHCO2198 (Geller et al, 2013).

2. Materjal ja meetodika

2.1. Proovide kogumine ja töötlus

Mullaproovid (koos varisega) koguti ajavahemikul 15.07.2022 kuni 19.09.2022 (Tabel 1). Igalt alalt võeti kuus proovi (põhja-lõunasuunaliselt transektilt, kolmemeetrise vahedega). Ühe proovikoha suurus oli 10 x 20 cm ja sügavus 5 cm. Kogutud materjal asetati minigrip kottidesse, mis seejärel homogeniseeriti ning jagati kaheks võrdseks osaks. Esimesest osast eraldati mullaloomad nende morfoloogiliseks määramiseks ja triipkoodistamiseks. Teise osa muld kuivatati *meta*-triipkoodistamise jaoks.

Tabel 1. Proovialad

Ala	Tüüp	Ala iseloomustus	Kogumise kuupäev	Koordinaadid
1	Kuiv heitlehine	Kase enamusega segamets, esinevad üksikud männid, toomingad ja pihlakad.	15.07.2022	58,3442°N 26,684°E

	mets	Puude vanus on ligikaudu 45 aastat. Rohurindes kasvab metsmaasikas, väikeseõieline lemmalts, kõrrelised ja sõnajalad. Samblarinne paigutine. Varist võrdlemisi vähe.		
2	Niiske heitlehine mets	Rommelga enamusega lehtmets, esinevad üksikud lepad, pihlakad ja kased. Puude vanus on ligikaudu 45 aastat. Rohurindes metsmaasikas, väikeseõieline lemmalts, kõrrelised, sõnajalad ja osjad. Samblarinne paigutine. Varist võrdlemisi vähe.	15.07.2022	58,3447°N 26,6856°E
3	Segamets	Haava enamusega segamets. Esinevad mõned tammed, kased ja toomingad. Leidub palju vaarikaid. Rohurindes väikese-õieline lemmalts ja naat.	09.08.2022	58,3027°N 26,5486°E
4	Noor lehtpuumets	Kase enamusega noor lehtpuumets. Esineb pihlakat ja haaba, üks kuusk. Rohurindes jänese kapsas, mets-maasikas, väikse-õieline lemmalts, sõnajalad ja osjad.	09.08.2022	58,3017°N 26,5532°E
5	Pärisaruniit	Madala taimestikuga parasniiske niit. Homogeenne maastik. Esineb palju võilille, hanijalga, tulikat, leidub oblikaid.	01.09.2022	58,3934°N 26,6963°E
6	Aruniit	Madala taimestikuga liigivaene aruniit.	06.09.2022	58,3531°N

		Homogeenne maastik. Esineb raudrohtu, madarat, keraheina, timutit ja võilille		26,6086°E
7	Rannaniit	Karjatav parasniiske niit. Esineb angervaksa.	19.09.2022	59,3715°N 25,0006°E

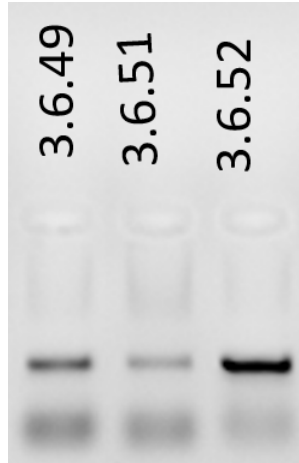
Laboris mõõdeti morfoloogiliseks määramiseks ja triipkoodistamiseks minevate proovide ruumala. Ühe proovi suurus oli 0,5 liitrit. Lestade mullast ekstraheerimiseks kasutati Eesti Maaülikooli Taastuvate Loodusvarade Teaduskeskuse laboris olevaid Tullgreni aparate. Proove hoiti eklektoris üks nädal. Isendeid säilitati 95% etanoolis temperatuuril -20 °C. Loomad sorteeriti ja loendati kasutades binokulaarmikroskoopi Leica S8APO (suurendusega 60x). Teostati ka esmane määramine (taksonini milleni väike suurendus võimaldab määrata, reeglina sugukonnani), mille põhjal koostati algandmestik. Esimese kolme ala loomad triipkoodistati. Ühest morfotüübist valiti DNA eraldamiseks kuni kuus isendit, mis pandi eraldi 0,2 ml tuubi, mis sisaldas 95% etanooli. Järgnes DNA eraldamine Tartu Ülikooli Oecologicumis mükoloogia laboris.

2.2. DNA eraldamine ja PCR

2.2.1. Mullalestad

Et DNA-d eraldada saaks, tuli vabaneda üleliigsest etanoolist, selleks pipeteeriti loomad binokulaari kasutades eraldi märgistatud uute tuubi. Väikesed (alla 300 µm) ja läbipaistvad loomad pipeteeriti nende nägemiseks esmalt Petri tassile ja siis tõsteti nõelaga uude tuubi. Puhtuse tagamiseks steriliseeriti lestadega kokkupuutes olnud esemeid iga kord piirituselambi all. Uues tuubis olevatele loomadele pipeteeriti peale lüüsiseseugu (Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix). Antud töö käigus testiti ka 30 °C juures etanooli aurustumist aga kuna loomad kuivasid sageli tuubi seina külge kinni ja läksid kergemini katki, otsustati, et mõistlikum on loomad etanoolist siiski välja pipeteerida.

DNA eraldati lestadest mittedestruktiivselt kasutades Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) komplekti. Lüüsiseseugu valmistamiseks isendi kohta võeti lüüsi puhvrit 20 µl, millele lisati 0,6 µl proteinaas K ja tsentrifuugiti vedelik tuubi põhja. DNA eraldus toimus 98 °C juures 1 minuti jooksul. Järgnevalt pipeteeriti lüüsilahus (mis sisaldas isendi DNA'd) eraldi märgistatud uute tuubi. Lüüsilahuses olnud lestad tõsteti 95% etanooli hilisemaks morfoloogiliseks määramiseks (peatükk 2.5). Ühe PCR-i reaktsiooniseugu maht 20 µl (master mix segu 10 µl, nukleasivaba deioniseeritud vesi, 7,2 µl, pärisuunaline praimer 0,4 µl ja vastassuunaline praimer 0,4 µl ja lesta DNA lahust 2 µl). Kui PCR esimesel korral ebaõnnestus, suurendati DNA lahuse kogust vee arvelt (3 µl DNA lahust ja vett 6,2 µl, praimerite ja master mixi segu kogus jäi samaks). Lisaks katsetati veel 4 µl DNA lahuse kogusega. Mitokondriaalse DNA COI lõigu amplifitseerimiseks kasutati universaalseid indekseeritud (8 aluspaarilised indeksid) primereid LCO1490 - HCO21098 (Folmer et al, 1994), mis paljundavad ~ 658 aluspaarilise lõigu. PCR programm LCO1490 - HCO21098 praimeritega oli järgnev: esmane DNA denaturatsioon: 94 °C juures 3 minutit, 94 °C juures 30 sekundit, 45 °C juures 1 minut, 68 °C juures 1 minut (5 tsüklit); 94 °C juures 30 sekundit, 51 °C juures 1 minut, 68 °C juures 1 minut (35 tsüklit); ning 68 °C juures 5 minutit. PCR'i produkte kontrolliti geelelektroforeesi abil. Agarosgeeli valmistamiseks kasutati 100 ml 1x TBE puhvit, kuhu lisati 1 g agarosi ning DNA visualiseerimiseks 5 µl *Atlas ClearSight DNA Stain* lahust (Bioatlas, Tartu, Eesti). Tardunud geelile kanti 5 µl PCR-produkti proovi kohta. Geelelektroforeesi jooksutati 15 minutit. Positiivsete DNA signaalide tugevused jaotati kolme kategooriasse – tugevad, keskmised ja nõrgad (joonis 3). Vastavalt sellele pipeteeriti raamatukogusse PCR produkti kogus. Tugeva signaali korral lisati 1 µl produkti, keskmise signaali korral 3 µl ja nõrga signaali puhul 6 µl produkti. PCR-produktide kogude puhastamiseks kasutati FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen-Biotech, Austria). Puhastatud proovid sekveneeriti Tartus, kasutades selleks ONT MinION sekveneerimisplatvormi (R10.4).



Joonis 3. DNA signaalide tugevused – proov 3.6.51 on nõrk, 3.6.49 keskmine ja 3.6.52 tugev signaal.

2.2.2. Lestade morfoloogiline määramine

Lestade määramiseks liigini morfoloogilisel meetodil tuli neist teha ajutised või püsipreparaadid. Esmalt tõsteti piirituses olevad loomad 5 minutiks destilleeritud vette, misjärel pandi loomad piimhappesse (60-95% vesilahus) ja soojendati pliidil ~60 °C temperatuuri juures 6 minutit (erandiks olid röövlestade täiskasvanud emased isendid, imilestad, kõdulestade hüpopused ja väiksemad sarvlestad, kes pandi ööpäevaks piimhappesse). Piimhape lahustab lestade pehmed koed, mistõttu loom muutub hästi (läbi)nähtvataks. Pärast piimhapest väljavõtmist loputati lesti destilleeritud vees 5 minutit. Järgnes loomadest preparaate tegemine, milleks kasutati Hoyeri lahust. Preparaate vaadeldi mikroskoobiga Leica DM 6000 P (suurendus 800x) ja osadel juhtudel ka skaneeriva elektronmikroskoobiga Zeiss EVO MA 15. Antud töös on teaduslike nimede kirjutamisel lähtutud Rahvusvahelise Zooloogilise Nomenklatuuri Koodeksi lisa B punktist 6 (International Code of Zoological Nomenclature Online).

2.2.3 *Meta*-triipkoodistamine mullaproovidest

Mullaproovid *meta*-triipkoodistamise jaoks kuivatati paberikottides kuivatuskapis 38° C juures 24 tundi. Kuiv muld (proovi kohta) tõsteti ümber minigrip kilekotti, homogeniseeriti käte vahel hõõrudes pulbriks, millest kaaluti välja 0,2 ja 2 grammised alamproovid DNA eralduse jaoks (2 g mullaproove sekveneeriti ainult aladelt üks kuni viis). DNA eraldati DNeasy PowerSoil Pro (0,2 g) ja PowerMax Soil (2 g) eralduskomplektidega (Qiagen, Germany). Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) viidi läbi DNA praimeritega LCO1490 ja HCO2198 (Folmer et al, 1994),

ning mlCOIintF (Leray et al, 2013) ja jgHCO2198 (Geller et al, 2013), mis amplifitseerivad vastavalt 658 ja 313 aluspaari mitokondriaalse DNA COI lõigust. PCR'i segu proovi kohta oli 25 µl, mis sisaldas 5 µl 5× HOT FIREPol Blend Master Mix'i (Solis Biodyne, Eesti), 0.5 µl mõlemat praimerit (20 mM), üks µl DNA'd ja 18 µl vett. PCR'i seaded LCO1490 ja HCO2198 praimeritega olid samad nagu mainitud ülalpool, välja arvatud, et esmane denaturatsioon kestis 15 minutit, kuna *meta*-triipkoodistamise jaoks kasutati teistsugust DNA polümeraasi. PCR programm mlCOIintF ja jgHCO2198 praimeritega oli järgnev: esmane denaturatsioon 15 min 95 °C juures; 25 tsüklit 30 sekundit 95 °C, 30 sekundit 57 °C, 1 minut 72 °C juures; ning 10 minutit 72 °C. Ühe proovi kohta tehti kaks PCR kordust, mis sekveneerimise jaoks kokku pipeteerit. DNA lõikude amplifikatsiooni edukust vaadeldi 1% agarosgeelil. Amplifitseeritud DNA proovid pipeteeriti kokku (vastavalt signaali tugevusele agarosgeelil; nõrk = 7 µl, keskmine = 3 µl, tugev = 1 µl) ning puhastati Favor-Prep™ Gel/PCR Purification komplektiga (Favorgen-Biotech, Austria). Pikem COI lõik (658 aluspaari) sekveneeriti PacBio Sequel II masinaga (The Norwegian Sequencing Centre, Norra), ning lühem lõik (313 aluspaari) Illumina NovaSeq 6000 masinaga (Novogen, Suurbritannia).

2.3. Andmetöötlus

Triipkoodistamise eesmärk antud töös oli referents-sekventside saamine tõhustamiseks lestade määramist *meta*-triipkoodistamise kaudu. Kahjuks ei jõutud magistritöö esitamise tähtjaks triipkoodistamise (MinION) andmeid läbi analüüsida, et nendest tulenevaid sekventse referentsidena kasutada. Mass-sekveneerimise (PacBio ja Illumina) andmed töödeldi tarkvaraga PipeCraft2 v1.0.0 (Anslan et al, 2017; <https://pipecraft2-manual.readthedocs.io/>), kasutades seal implementeeritud DADA2 (Callahan et al, 2016) töövoogu PacBio ja Illumina andmestiku jaoks (vaikimisi sätetega). DADA2 tarkvara väljundina loodud ampliconi järjestuse variandid (*amplicon sequence variants*; ASVs) klasterdati 97% sarnasuse aluses kasutades 'ASV to OTU' moodulit PipeCraft2'es. Lisaks rakendati järelklasterdus LULU (Frøslev et al, 2017) tarkvaraga ('LULU' moodul PipeCraft2'es). Saadud OTU tabelist filtreeriti välja potentsiaalsed proovide indeksi-vahetuse (*tag-switching*) vead kasutades 'filter tag-jumps' moodulit. Viimaks filtreeriti välja OTU'd, millede järjestustes esines stopkoodoneid ning olid lühemad kui 310 ja 649 aluspaari, vastavalt Illumina ja PacBio andmete puhul. Selleks kasutati 'filter numts' moodulit

PipeCraft2^{es}. OTU^{de} taksonoomilise kuuluvuse määramiseks kasutati tarkvara RDP classifier (Wang et al, 2007) ning andmebaasina CO1-classifier v5.1.0 (Porter & Hajibabaei, 2018). OTU^d määrati ämblikulaadsete klassi (kuhu kuuluvad ka lestad) kui määrangu kindlus (*bootstrap value*) oli vähemalt 0.8. Mass-sekveneerimise teel saadud tulemusi (lestade kooslused) võrreldi morfoloogilise määramise teel saadud tulemustega. Erinevate meedotite teel saadud liigirikkuse/OTU-rikkuse erinevusi testiti Kruskal-Wallis testiga kasutades ‘stats’ v4.1.3 paketti R v4.1.3 tarkvaras (R Core Team, 2023). Erinevate meedotite teel tuvastatud lestakoosluste ordinatsioone võrreldi Procrustes testi abil kasutades ‘vegan’ v2.6.4 (Oksanen et al, 2022) paketti. Ordinatsioonide tegemiseks kasutati pcoa (principal coordinate analysis) käsku pakettis ‘ape’ v5.7.1 (Paradis & Schliep, 2019). Ordinatsioonide jaoks transformeeriti andmed 1/0 maatriksiteks (liigi/OTU esinemine või puudumine proovis) ning proovidevaheline sarnasusindeks arvutati kasutades Bray-Curtis indeksit R pakettis ‘vegan’. Jooniste tegemiseks kasutati ‘ggplot2’ v3.5.0 (Wickham, 2016) paketti. Venn diagrammide tegemiseks kasutati Venni^t (Oliveros, 2007).

2.4. Tööjaotus antud magistritöö valmimisel

Antud töö autor kogus proovid, sorteeris proove ja loendas isendeid; teostas esmast määramist (röövlestad), prepareeris lestad, tegeles laboritöödega (DNA eraldus, PCR). Kaarel Sammet loendas ja määras lesti liigini. Rasmus Puusepp teostas PCR produktide puhastamist. Manikandan Ariyan teostas mullaproovide *meta*-triipkoodistamise laboritöö. Sten Anslan ja töö autor teostasid andmetöötluse. Töö autor kirjutas ja vormistas antud magistritöö.

3. Tulemused

3.1. Lestade morfoloogiline määramine

Kokku loendati 7 alalt 4444 lestaistendit, nendest morfoloogiliselt liigini määramatuid noorloomi on 1172 (26%). Esimesel kolmel alal loendatati 1810 lesta (nende hulgast valiti välja isendid triipkoodistamiseks), nendest noorloomi 475 (26%). Esimese kolme ala peale tuvastati morfoloogiliselt määrates 103 unikaalset taksonit ehk vähemalt 103 eri liiki (nendest 64 (62%) on sarvlestialised (sh kõdulestialised), 26 (25%) röövlestialised ja 13 (13%) imilestialised. Kõigi 7

ala peale tuvastati morfoloogiliselt määrates vähemalt 62 sugukonda või kõrgemat taksonit (nendest 36 on sarvlestalised (sh kõdulestad), 13 röövlestalised ja 12 imilestalised ning 1 Endeostigmata). Kõige enam esines sugukonna Suctobelbidae (387), Oppiidae (337) ja Tectocephidae (285) isendeid. Nad on kõdutoidulised ning mõõtmetelt suhtelised väikesed sarvlestad (Weigmann, 2006).

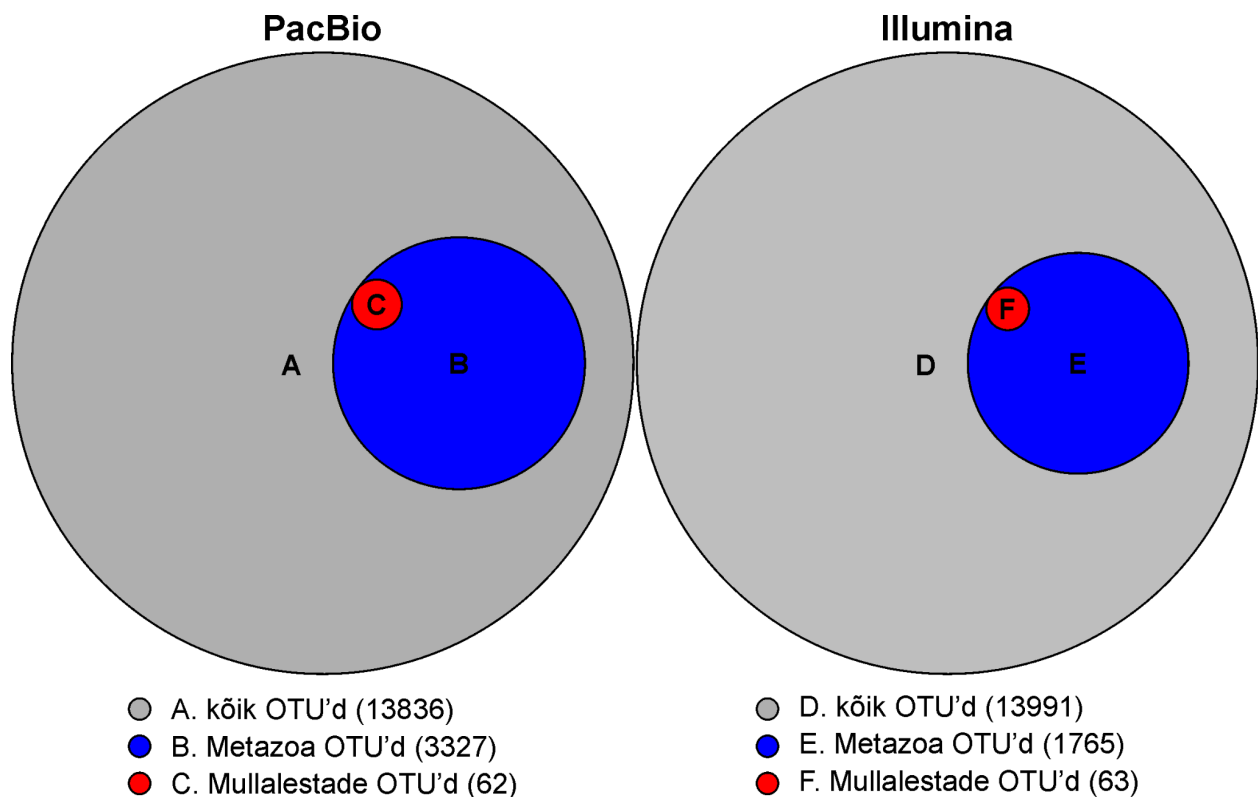
3.2. Lestade triipkoodistamine

DNA triipkoodistamiseks valiti 840 looma, kellest 639 (76%) andsid positiivse DNA signaali, nendest omakorda 463 (55%) andsid positiivse DNA signaali esimesel korral. PCR-i uuesti tehes andsid 176 isendit positiivse signaali kui DNA kogust oli suurendatud 4 µl (34 korral) või 3 µl (142 korral) võrra. Positiivset DNA signaali ei õnnestunud saada 201 lesta puhul (24%). DNA tugevuse järgi jagunesid signaalid: tugev 351 korral, keskmine 91 korral ja nõrk 197 korral, nendest pipeteeriti kokku 1540 µl produkti, mille DNA kontsentratsioon oli 94,6 ng/mL. Morfoloogiliselt liigini määrata õnnestus 639-st isendist 513. 12 triipkoodistatud isendit ei õnnestunud liigini määrata, kuna nad osutusid noorloomadeks. Töö eri etappides läks kaduma 80 looma (nendest 18 enne DNA eraldamist). Kadunud loomad kuulusid seltsi sarvlestad (31 sh 2 Astigmatat), röövlestad (6) ja imilestad (42) ning 1 Acariformes, keda ei õnnestunud seltsini määrata. Kaduma läinud sarvlestad kuulusid erinevatesse sugukondadesse, aga enim oli Suctobelbidae (8) ja Oppiidae (5) sugukonna esindajaid. Nad on sarvlestade kohta heledat värvi ja suhtelist väikesed (Suctobelbidae sugukonna liikide suurused jäävad 170–300 µm ja Oppidae 120–550 µm vahemikku) (Weigmann, 2006). Imilestadest 9 läks kaduma enne DNA eraldamist, 27 DNA vedeliku ja looma lahku pipeteerimise käigus ning 6 kudede lahustumise käigus. Kaduma läinud imilesti iseloomustab samuti väike suurus (alla 300 µm) ja läbipaistvus.

3.3. DNA *meta*-triipkoodistamine

Keskmine PacBio sekveneerimissügavus proovi kohta oli 1942 (miinimum 2 ja maksimum 13447). *Meta*-triipkoodistamise andmete analüüsi käigus saadi 13836 OTU't (joonis 4), millest 5483-e (39.6%) OTU taksonoomiline määrang riigi tasemele oli vähemalt 0,8 (*bootstrap* väärtus). Seega 8353 OTU't ei õnnestunud isegi riigi tasemele piisava kindlusega määrata. Riigi tasemele määratud 5483-est OTU'st, olid 3327 Metazoa (loomad), 1695 määramata eukarüoodid,

375 seened, 35 bakterid ja 6 OTU't taimed. Allpool olevate analüüside jaoks kasutati ainult OTU'sid, mille esindussekvents ei sisaldanud stopkoodoneid ning olid määratud ämblikulaadsete (Arachnida) klassi bootstrap väärtusega $\geq 0,8$. Viimaseid oli kokku 62, mis moodustasid kogu andmestikust (järjestuste arv) 0.73%. Nendest 44 (71%) olid sarvlestalised, 2 (3%) röövlestalised, 10 (16%) imilestalised ja 6 täpsemalt määramata ämblikulaadsed (9%). Lestade liigimäärangu kriteeriumiks valiti antud töös vähemalt 0,95 bootstrap väärtus. Liigini määrati 29, perekonnani 5, sugukonnani 11, seltsini 11 ning klassini 6 OTU't.



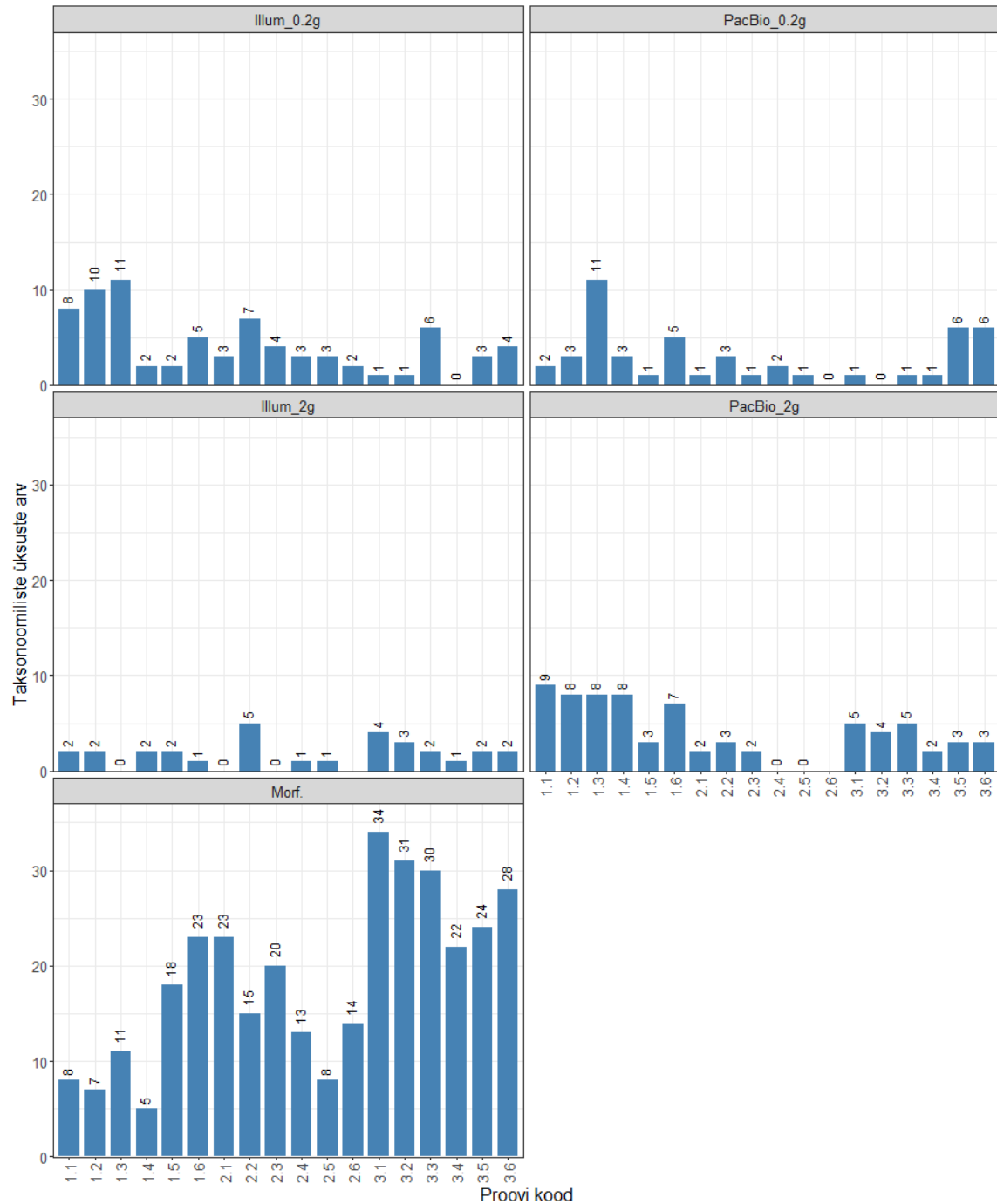
Joonis 4. Venni diagramm, kus on esitatud kõikide OTU'de osakaalud, loomade (Metazoa) osakaal kõikidest ja lestade osakaal kõikidest loomadest (PacBio ja Illumina sekveneerimisandmetel).

Keskmine Illumina sekveneerimissügavus proovi kohta oli 152875 (miinimum 1862 ja maksimum 1834070). *Meta*-triipoodistamise andmete analüüsi käigus saadi 13991 OTU't (joonis 4), nendest 1765 loomad (Metazoa). Piisava kindlusega riigi tasemele ei õnnestunud määrata 8671 OTU't. Riigi tasemele määratud 5306-est OTU'st, 168 on määramata eukarüoodid, 3325

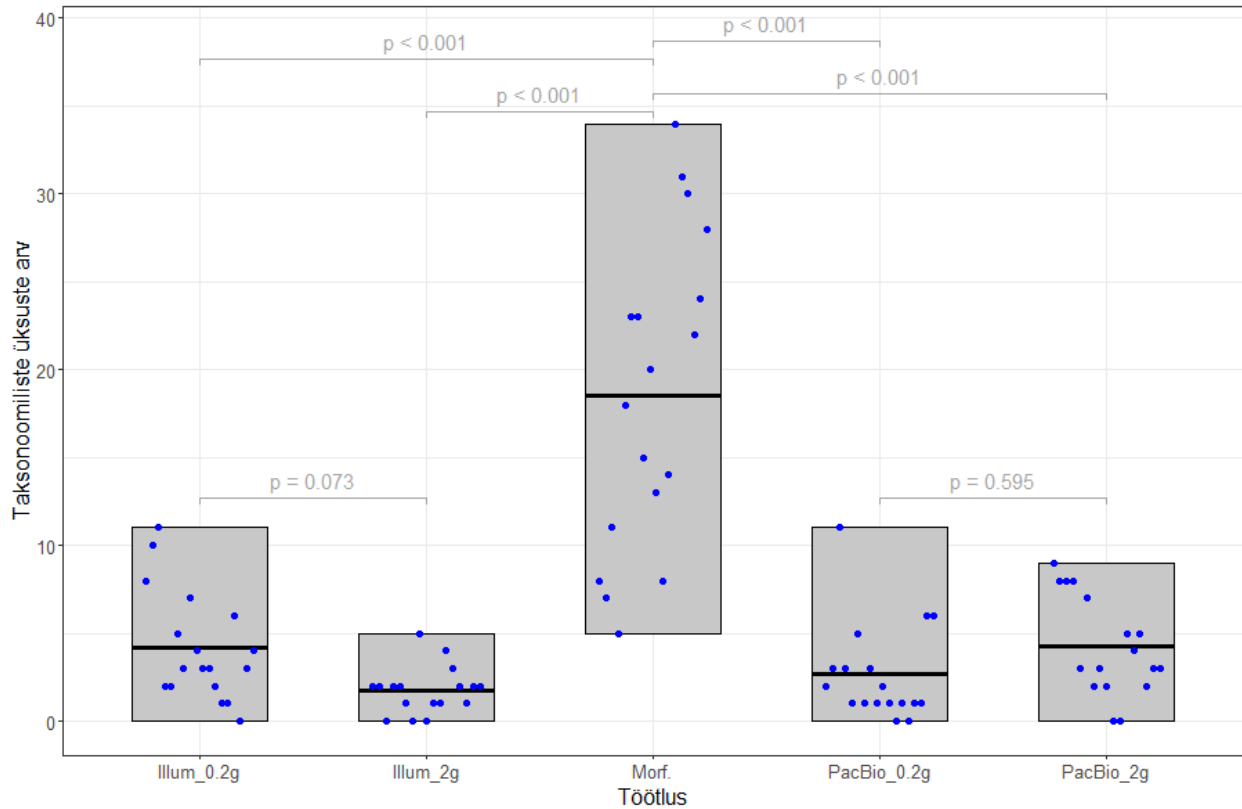
seened, 31 bakterid ja 2 OTU't taimed. Lesta OTU'sid oli kokku 63. Nendest 50 (79%) sarvlestalised, 7 (11%) röövlestalised, 4 (6%) imilestalised ja 2 (3%) ämblikulaadset. Liigini määrati 34, perekonnani 19, seltsini 8 ning klassini 2 OTU't. Allpool olevate analüüside jaoks kasutati ainult OTU'sid, mille esindusjärjestused ei sisaldanud stopkoodoneid ning olid määratud ämblikulaadsete (Arachnida) klassi bootstrap väärtusega $\geq 0,8$. Viimaseid oli kokku 63, mis moodustasid kogu andmestikust (järjestuste arv) 0.14%.

3.4. Lestade tuvastamine morfoloogilise vs. molekulaarse määramise teel

Morfoloogilise ja molekulaarse määramisel (PacBio'ga ja Illuminaga'ga) saadud tulemuste vahel esinevad suured erinevused, lisaks sellele, et molekulaarselt tuvastati vähem eri taksoneid (joonised 5 ja 6), olid need taksonid ka üksteisest erinevaid. Esimeselt kolmelt alalt tuvastati morfoloogiliselt kõikidest proovidest taksoneid, kuid mõlema molekulaarse meetodi puhul leidis alamproove, kus ühtegi taksonit ei tuvastatud. Enim tuvastati taksoneid morfoloogiliselt (kõige rohkem 34 ja kõige vähem 5, keskmiselt 18,5), PacBio'ga leiti 2 g mullast kõige rohkem 9 ja kõige vähem 0, keskmiselt 4 ning 0,2 g mullast kõige rohkem 11 ja kõige vähem 0, keskmiselt 2,6. Illumina'ga leiti 2 g mullast kõige rohkem 5 ja kõige vähem 0, keskmiselt 1,6 ning 0,2 g mullast kõige rohkem 11 ja kõige vähem 0, keskmiselt 4,2 taksonit. PacBio'ga sekveneerides saadi 2 g mullast rohkem lestade OTU'sid kui 0,2 g mullast, samas Illumina'ga sekveneerides saadi 0,2 g mullast rohkem lestade OTU'sid kui 2 g mullast. Võrreldes omavahel taksonite arve 2 g ja 0,2 g alamproovidest PacBio'ga sekveneeritud 18 proovist oli 0,2 g proovidest võrreldes 2 g proovidega suurem taksonite arv 5 korral, ühel korral oli leitud taksonite arv võrdne, kui liita kõik OTU'd kokku siis 0,2 g alamproovis oli 48 ja 2 g alamproovis 72 OTU't. Võrreldes omavahel taksonite arve 2 g ja 0,2 g alamproovidest Illumina'ga sekveneeritud 18 proovist oli 0,2 g proovidest võrreldes 2 g proovidega suurem taksonite arv 12 korral, kahel korral oli leitud taksonite arv võrdne. Samuti esineb suur erinevus kui liita kõik OTU'd kokku (0,2 g oli 75 ja 2 g 30 OTU't). Illumina'ga sekveneeritud alamproovide vahel puudub statistiliselt oluline erinevus ($p=0,073$), samuti puudub statistiliselt oluline erinevus PacBio'ga sekveneeritud alamproovide vahel ($p=0,595$), kuid esineb statistiliselt oluline erinevus morfoloogiliste määrangute ja molekulaarsete määrangute (sh nende alamproovide) vahel ($p < 0,001$) (joonis 6).

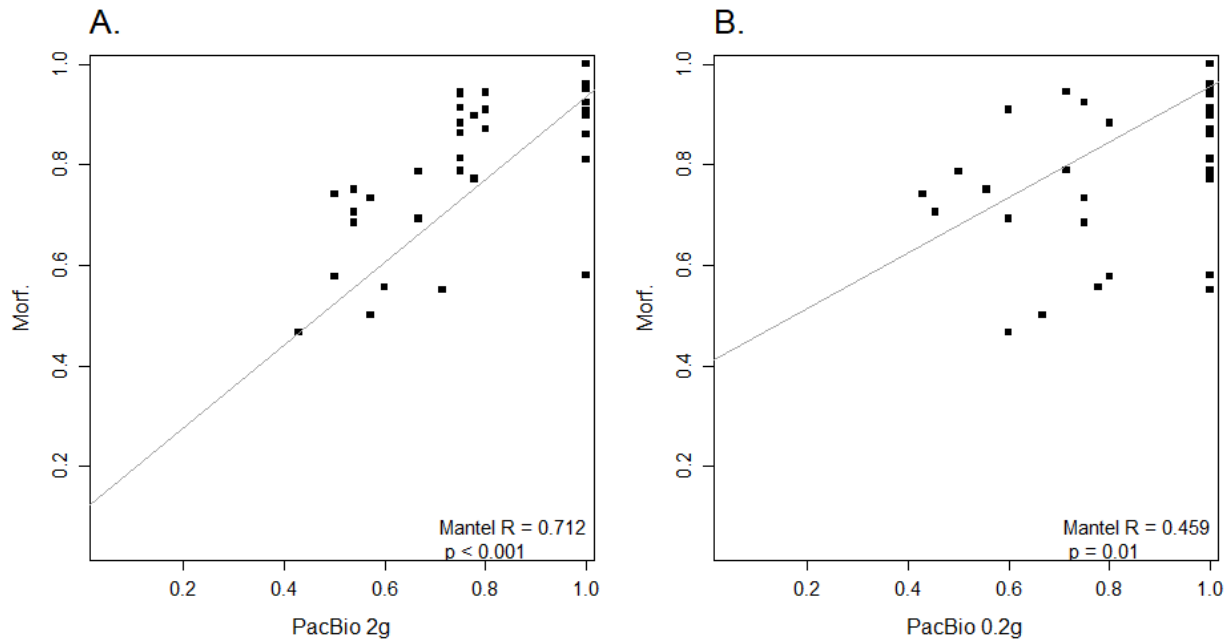


Joonis 5. Taksonoomiliste üksuste arvud proovi kohta, Illumina ja PacBio molekulaarsed määrangud DNA põhjal – DNA_0.2_g (mullakogus 0,2 g) ja DNA_2_g (mullakogus 2 g) ning morfoloogilised määrangud – Morf.

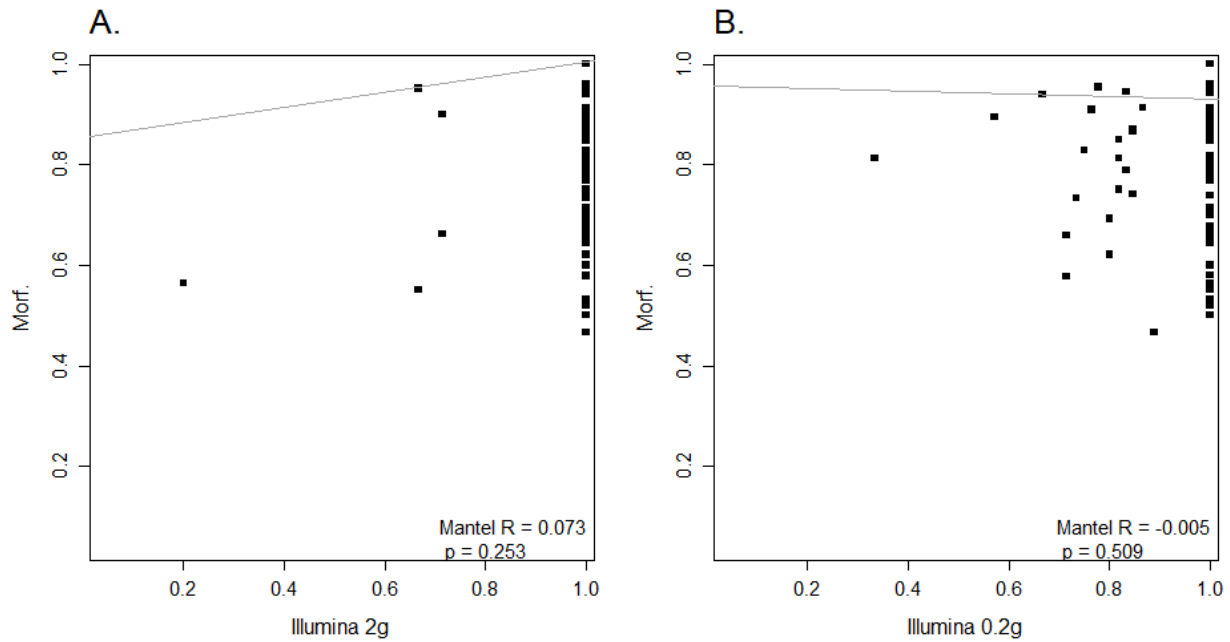


Joonis 6. Taksonoomiliste üksuste arvud proovi kohta, keskmised väärtused ja väärtuste varieeruvus. Iga kahe proovi vahel on välja toodud paarikaupa Wilcoxon testi põhjal saadud erinevuste p-väärtused. Sinised täpid tähistavad kindlaks tehtud taksonite arvu meetodi kohta. Illumina molekulaarsed määrangud DNA põhjal – Illum_0.2g (mullakogus 0,2 g), Illum_2g (mullakogus 2 g), morfoloogilised määrangud – Morf, PacBio molekulaarsed määrangud DNA põhjal – PacBio_0.2_g (mullakogus 0,2 g) ja PacBio_2_g (mullakogus 2 g).

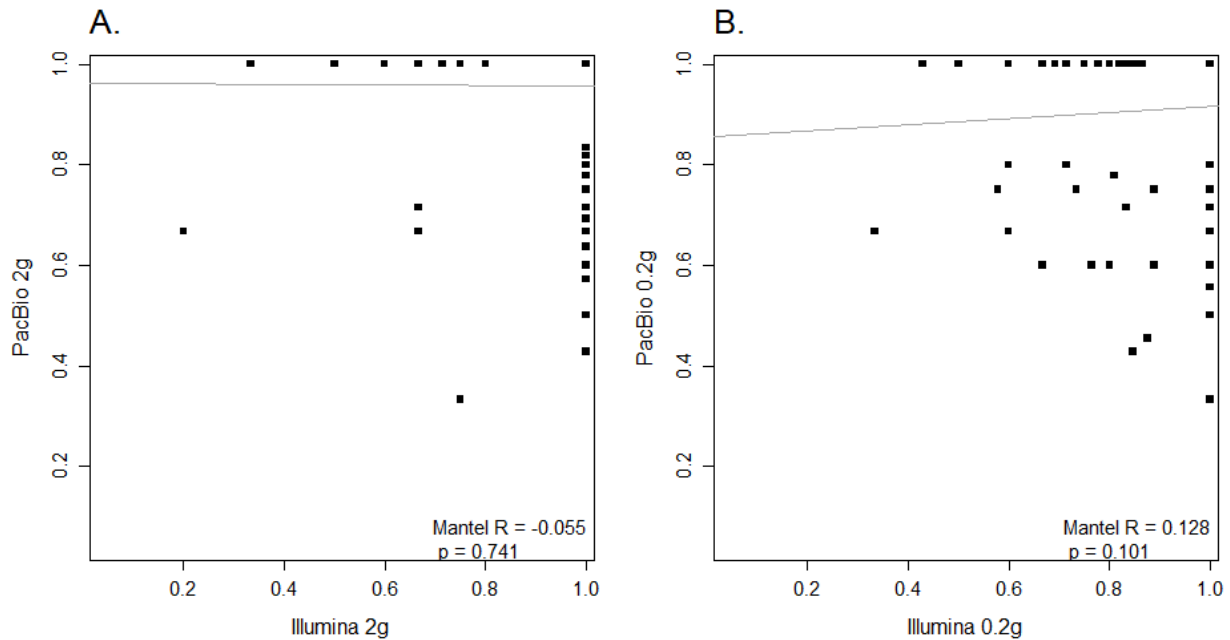
Morfoloogilisel määramisel ja PacBio'ga mõlema mullakoguse sekveneerimisel saadud määrangutel leiti statistiliselt oluline sarnasusseos proovialade vahel ($p < 0,05$) (joonis 7). Morfoloogilisel ja Illumina'ga mullakogustest 2 g ja 0,2 g määramise tulemuste vahel ei leitud statistiliselt olulist seost ($p = 0,253$ ja $p = 0,509$) (joonis 8). Võrreldes omavahel molekulaarseid meetodeid, ei leitud statistiliselt olulist seost nii PacBio 2 g ja Illumina 2g proovide vahel ($p = 0,741$) kui ka PacBio 0,2 g ja Illumina 0,2g proovide vahel ($p = 0,101$) (joonis 9).



Joonis 7. Proovidevahelised seosed (erinevuste indeksid) mullalestade koosluste osas morfoloogilise vs. molekulaarse (PacBio) meetodite vahel. X-teljel paarikaupa erinevuste indeksid *meta*-triipkoodistamise proovide vahel (A. 2 g ja B. 0,2 g mullaproovide töötlusted) ja Y-teljel paarikaupa erinevuste indeksid paarikaupa erinevuste indeksid morfoloogilise määramise (Morf.) proovide vahel. Hall joon tähistab lineaarregressiooni sirget.

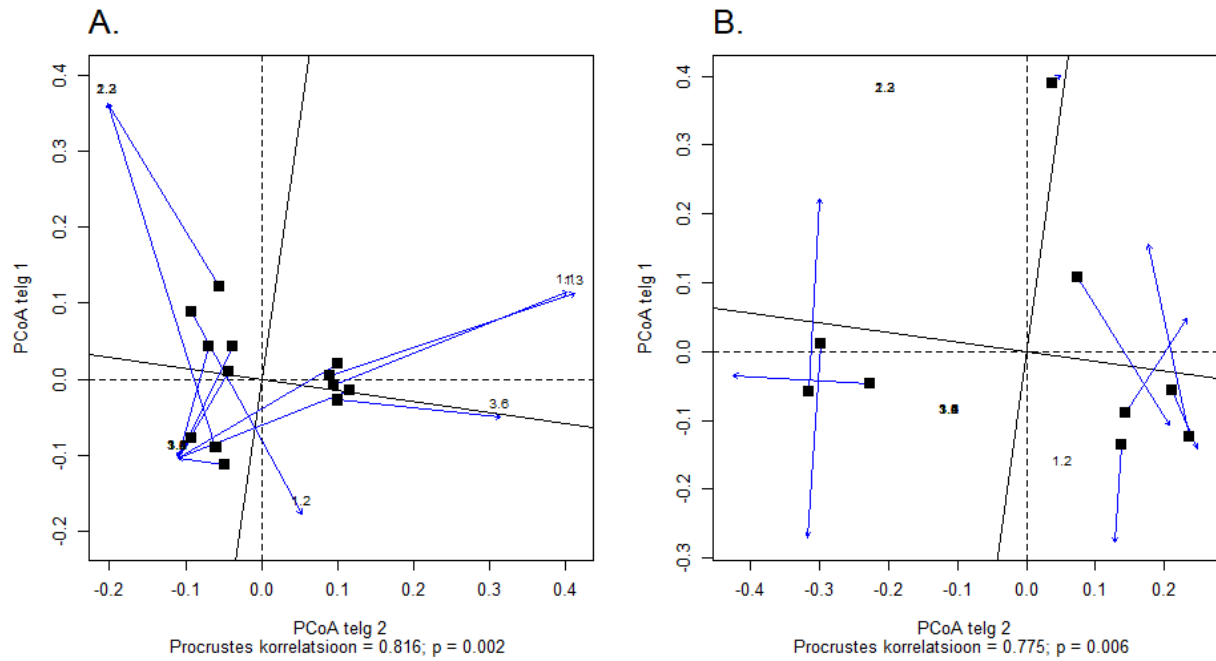


Joonis 8. Proovidevahelised seosed (erinevuste indeksid) mullalestade koosluste osas morfoloogilise vs. molekulaarse (Illumina) meetodite vahel. X-teljel paarikaupa erinevuste indeksid *meta*-triipkoodistamise proovide vahel (A. 2 g ja B. 0,2 g mullaproovide tötlused) ja Y-teljel paarikaupa erinevuste indeksid paarikaupa erinevuste indeksid morfoloogilise määramise (Morf.) proovide vahel. Hall joon tähistab lineaarregressiooni sirget.

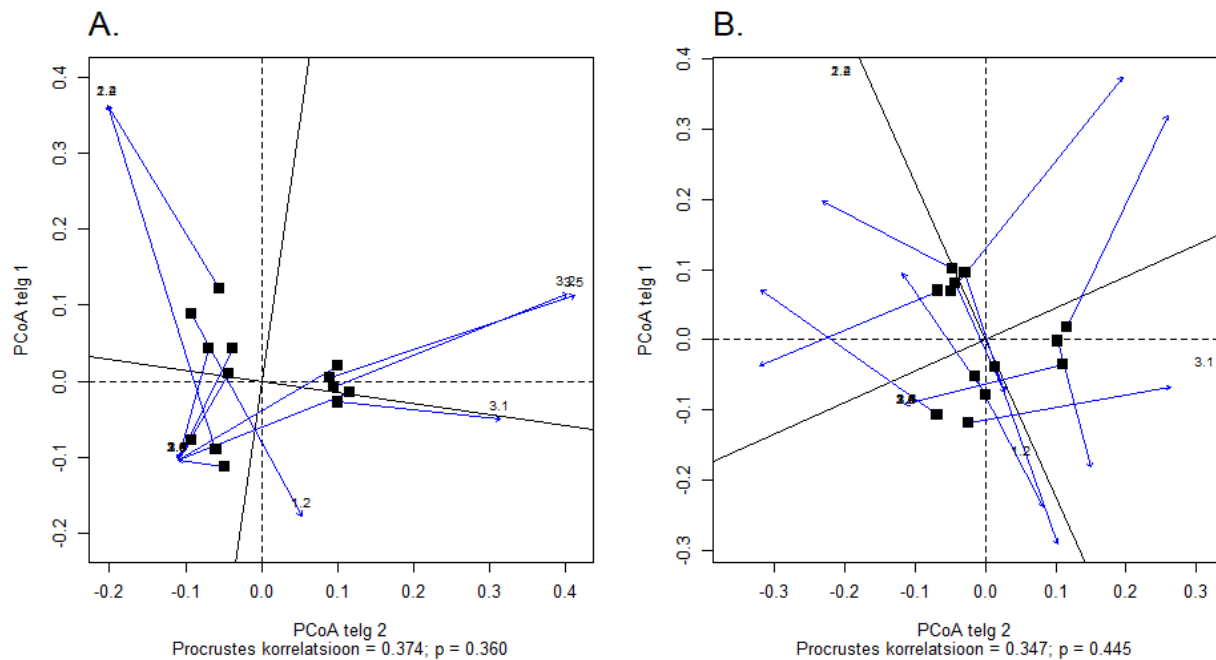


Joonis 9. Proovidevahelised seosed (erinevuste indeksid) mullalestade koosluste osas PacBio vs. Illumina meetodite vahel. X-teljel paarikaupa erinevuste indeksid Illumina proovide vahel (A. 2 g ja B. 0,2 g mullaproovide töötused) ja Y-teljel paarikaupa erinevuste indeksid paarikaupa erinevuste indeksid PacBio proovide vahel. Hall joon tähistab lineaarregressiooni sirget.

Peakomponentanalüüsi tulemused kinnitavad eelnevat, viidates, et morfoloogilise ja molekulaarse analüüsi määramise (PacBio) ja morfoloogilise määramise teel saadud tulemused erinevad oluliselt üksteisest ($p < 0,05$) (joonis 10), samas molekulaarse määramise (Illumina) ja morfoloogilise määramise teel saadud tulemused ei ole statistilised olulised ($p > 0,05$) (joonis 11).



Joonis 10. Peakomponentanalüüsi korrelatsiooni joonised. Võrdluses on molekulaarse määramise (PacBio) ja morfoloogilise määramise teel saadud tulemused (A. 2 g ja B. 0,2 g mullaproovide töötused). Punktid on peakomponentanalüüsi ordinatsioon morfoloogiliste andmete põhjal, siniste noolte suund viitab proovide asukohale PacBio andmetes, ning olulisused Procrustese testi põhjal.

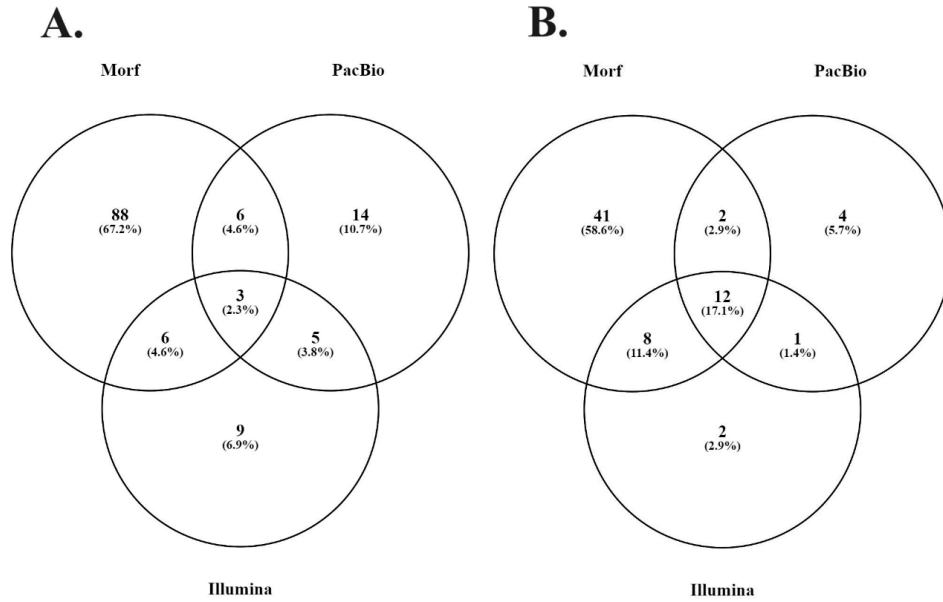


Joonis 11. Peakomponentanalüüsi korrelatsiooni joonised. Võrdluses on molekulaarse määramise (Illumina) ja morfoloogilise määramise teel saadud tulemused (A. 2 g ja B. 0,2 g mullaproovide töötused). Punktid on peakomponentanalüüsi ordinatsioon morfoloogiliste andmete põhjal, siniste noolte suund viitab proovide asukohale Illumina andmetes, ning olulisused Procrustese testi põhjal.

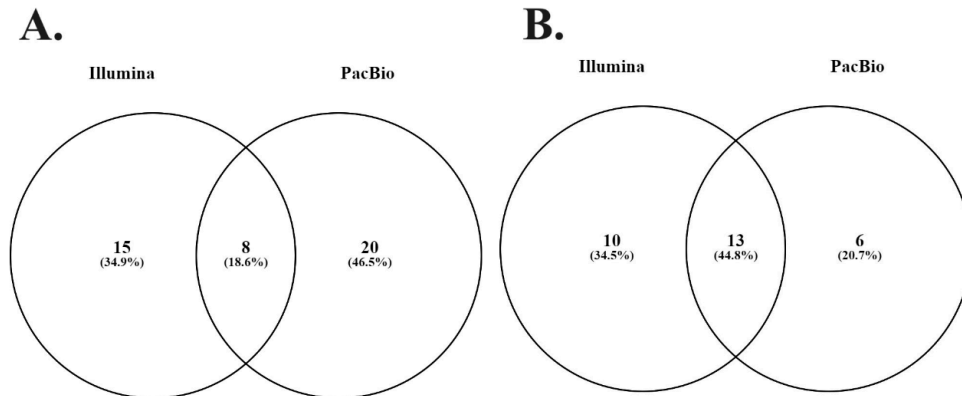
Võrreldes omavahel esimese kolme ala proovide morfoloogilisi ja molekulaarseid (PacBio, mullakogused 2 g ja 0,2 g) määranguid alade kaupa, jäi tuvastatud ühiste taksonite (enamasti liikide) osakaal vahemikku 0 kuni 6% (keskmiselt 2,6%). Kõigil seitsmel alal saadud sugukondade omavahelisel võrdluses selgus, et tulemused kattuvad 0 kuni 8,6 %, (keskmiselt 0,33%), 2 g mullaproove sekveneeriti kuni aladelt ainult üks kuni viis, alalt 7 ei tuvastatud lesti 0,2 g mullas.

Võrreldes omavahel esimese kolme ala proovide morfoloogilisi ja molekulaarseid (Illumina, mullakogused 2 g ja 0,2 g) määranguid alade kaupa, jäi tuvastatud ühiste taksonite (enamasti liikide) osakaal vahemikku 0 kuni 6,8 % (keskmiselt 2,95%). Kõigil seitsmel alal saadud sugukondade omavahelisel võrdluses selgus, et eri meetoditel saadud tulemused kattuvad 0 kuni 18,7 %, (keskmiselt 7,3%).

Võrreldes omavahel kõiki kolme kasutatud meetodit (sh alamproove) esimeselt kolmelt alalt leitud kõigi tuvastatud unikaalsete taksonite (enamasti liikide) kattuvusi, näeme, et nende osakaal varieerub 2,3% kuni 4,6% vahel (3,8%). Kõigil kolmel meetodil tuvastati ainult 3 ühist liiki, need olid sarvlestad *Heminothrus targionii*, *Hypochothoniella minutissima* ja *Oppiella nova*. Seitsme ala sugukondade kattuvuste võrdlusel jääb kattuvuste osakaal vahemikku 1,4 kuni 17,1% (keskmisel 8,2%), kokku tuvastati 12 ühist sugukonda (joonis 12). Vaatades ainult molekulaarsete määrangute tulemusi perekondade ja liikide tasemel, oli kattuvus 18,6%, kokku tuvastati 8 ühist taksonit. Sugukondade tasemel oli kattuvus 44,8%, kokku tuvastati 13 ühist sugukonda (joonis 13).



Joonis 12. A. Morfoloogilise (Morf) ja molekulaarse määramise (PacBio ja Illumina) teel saadud unikaalsete taksonite (valdavalt liikide ja perekondade) omavaheline kattuvus, analüüsis esimesed kolm ala. B. Morfoloogilise (Morf) ja molekulaarse määramise (PacBio ja Illumina) teel saadud sugukondade omavaheline kattuvus, analüüsis kõik seitse ala.



Joonis 13. A. Molekulaarsel määramise (PacBio ja Illumina) teel saadud unikaalsete taksonite (valdavalt liikide ja perekondade) omavaheline kattuvus, analüüsis seitse ala. B. Molekulaarsel määramise (PacBio ja Illumina) teel saadud sugukondade omavaheline kattuvus, analüüsis seitse ala.

4. Arutelu

4.1. Morfoloogiline määramine

Käesoleva magistritöö käigus leiti morfoloogilise määramise teel 10 seni Eestis registreerimata liiki. Need on sarvlestad *Suctobelba reticulata* ja *Berniniella sp.*, röövlestad *Discourella modesta*, *Paragamasus runciger*, *Paragamasus jugincola*, *Trachytes pauperior*, *Leptogamasus succineus*, *Olopachys suecicus* ja imilestad *Scutacarus subterraneus* ja *Eustigmaeus sp.* *Suctobelba reticulata* on parasniiskete lehtpuumetsade liik, lähimad leiud pärinevad Rootsist (Moritz, 1970; Weigmann, 2006). *Discourella modesta* on rohumaade liik, lähimad leiud on Soomest (Huhta, 2016). *Paragamasus runciger* on mereranniku ja rohumaade liik, lähimad leiud on Soomest (Huhta, 2016). *Paragamasus jugincola* on leht- ja okaspuumetsade liik (Karg, 1993), lähimad leiud on Poolast (Urbanowski et al, 2022). *Trachytes pauperior* on metsamulla liik, lähimad leiud on Soomest ja Lätist (Salmane & Brumelis, 2010; Huhta, 2016). *Leptogamasus succineus* on lehtpuumetsade liik, lähimad leiud on Soomest (Huhta, 2016). *Olopachys suecicus* on lehtpuumetsade liik, kes elab nii mahalangenud lehtedel kui ka samblas (Karg, 1993), lähimad leiud on Lätist (Salmane & Brumelis, 2010). *Scutacarus subterraneus* elab metsamullas ja varisekihis, ta on foreetiline murelastel (*Lasius*) (Khaustov, 2008; Baumann, 2023), lähimad leiud Leedust (Eitminaviciute, 2003). Mõne liigi puhul leiti erinevusi liigile iseloomulikust välimusest, näiteks morfoloogilise määramise käigus leiti isendeid, kes olid välimusest identsed liigiga *Galumna lanceata*, välja arvatud ühe tunnuse poolest (erinevad hingamisorganid). Samast proovist leiti nii *Galumna lanceata* kui ka *Galumna cf. lanceata* isendeid. DNA triipkoodistamise käigus õnnestus saada mõlema järjestused. *Galumna cf. lanceata* DNA järjestuse otsinguga GenBanki saadi vasteks perekonna *Pergalumna sp.* (sarnasus 92.55%) ja *Galumna lanceata* (sarnasus 92.12%) järjestusi. Võrreldes samast proovikohast leitud *Galumna lanceata* järjestust GenBankis asuvate *Galumna lanceata* järjestustega saadi sarnasuseks 91.21%. Selleks, et välja selgitada, kas tegemist on liigiga *Galumna lanceata* ja mis põhjustab polümorfisust, oleks vaja teha täiendavaid uuringuid.

4.2. DNA triipkoodistamine ja *meta*-triipkoodistamine

DNA triipkoodistamise käigus esines probleeme DNA signaalide saamisega. Esimesel korral ebaõnnestus 45% isendiproovidest, pärast DNA koguse suurendamist ei õnnestunud saada 24% isenditest positiivset DNA signaali. Ei ole täpselt teada kas ebaõnnestus DNA eraldamine või PCR. Teisi meetodeid (sh saastumise kindlamaid (Young et al, 2019)) kasutades on avaldatud töid, kus lestade DNA eraldamine olnud edukam. Samuti on leitud, et puhtama DNA saab kätte kui kasutada flotatsiooni (Arribas et al, 2016). Erinevates lesti käsitletud töodes on kasutatud erinevaid arve PCR tsükleid, näiteks on leitud, et kui tõsta tsüklite arv 40' nelt 60' nele paraneb PCR õnnestumine 58% (Young et al, 2019). Käesoleva magistritöö käigus sekveneritud DNA triipkoodistamise andmed on veel analüüsimata ning täpne töökuul on veel arendamisel. Meta-triipkoodistamise PacBio ja Illumina kogu andmestikust (järjestuste arv) moodustasid lestad vastavalt 0,73% ja 0,14%, sellest võib järeldada, et kasutatud praimerid olid liiga universaalsed, mistõttu paljundasid kergesti ka saastavaid järjestusi. Ainult 50% molekulaarsetest määrangutest (PacBio ja Illumina) määrati liigini.

4.3. Eri meetodite kombineeritud kasutamine

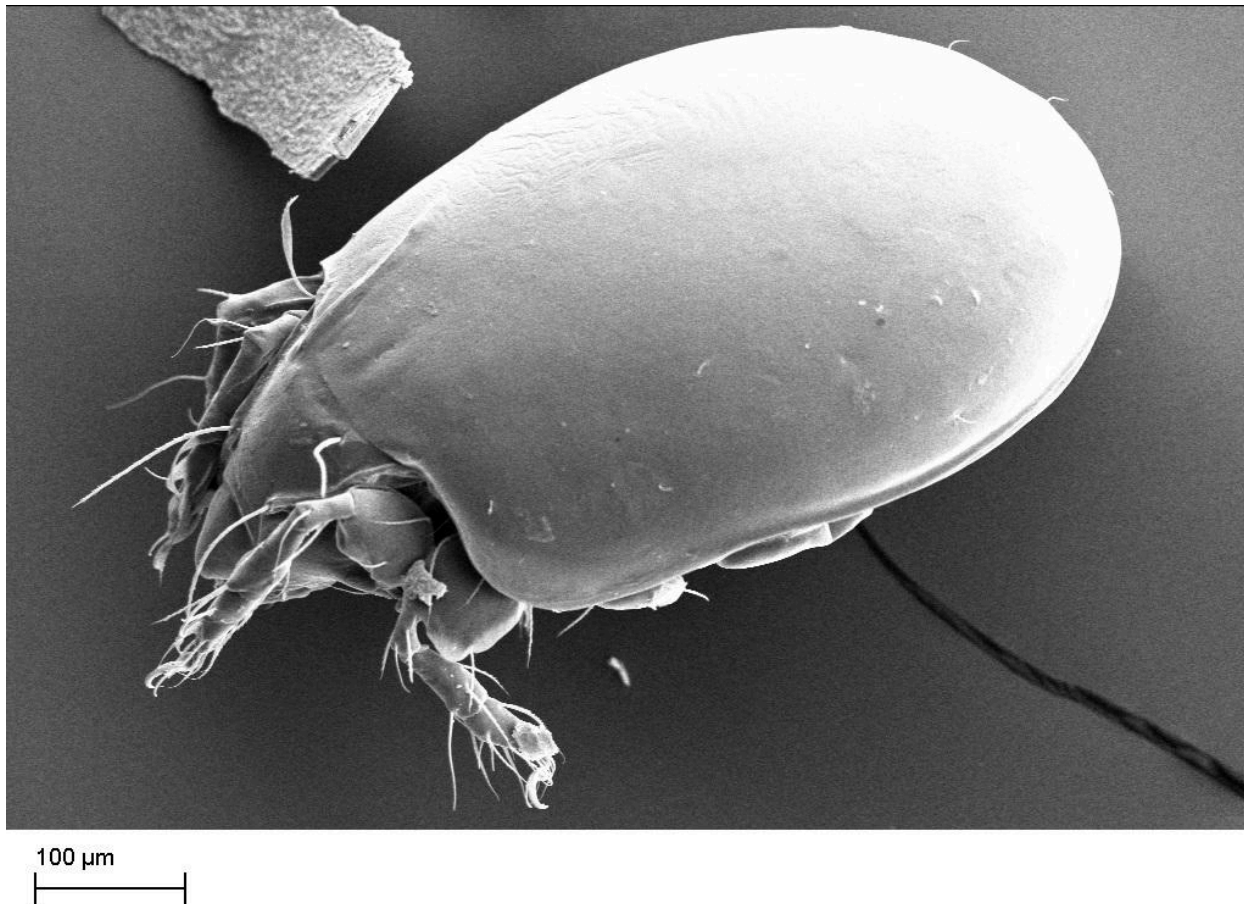
Molekulaarsed meetodid pakuvad olulist täiendust morfoloogilisele meetodile, kuna näiteks antud töös leitud isenditest moodustasid 26% morfoloogiliselt liigini määramatud noorloomad, samuti leiti mullast palju väikesi (alla 300 μm) ja läbipaistvaid loomi, kes võivad morfoloogilise määramise ettevalmistuse käigus kaduma minna, ka enamuse selles töö morfoloogilise määramise käigus kaduma läinud isenditest moodustasid just sellised loomad. Kõik kasutatud meetodid (morfoloogiline määramine, molekulaarne määramine kasutades PacBio ja Illumina sekvenerimis tehnoloogiaid) andsid oluliselt erinevaid tulemusi. Mantel testi põhjal leiti esimese kolme prooviala vahel teatud sarnasus ($p < 0,05$) morfoloogiliste ja PacBio'ga saadud määramistulemuste põhjal kuid peakomponentanalüüs näitas, et saadud tulemused erinevad oluliselt üksteisest ($p < 0,05$), seega kuigi liigirikkus oli PacBio'ga saadud väike (peaaegu olematu võrreldes morfoloogilistest andmetega), proovidevaheline seos on säilinud. Mantel testi põhjal selgus, et omavahel ei olnud sarnased morfoloogilise määramise ja Illumina'ga saadud molekulaarsed proovialade määrangud, samuti erinesid PacBio ja Illumina määrangute tulemused. Peakomponentanalüüsis tulemused kinnitasid, et olulist korrelatsiooni ei ole, seega,

kui tahtes hinnata tegelikku liigirikkust, ei saaks sellest ainult *meta*-triipkoodistamise andmete põhjal head ülevaadet. Kõige rohkem tuvastati taksoneid morfoloogiliselt (kolmelt alalt keskmiselt 18,5). Üllatavalt vähe lestade OTU'sid saadi molekulaarseid meetodeid kasutades. Eri alade liigilist kattuvust eraldi võrreldes leiti, et Illumina'ga proovide määrangud kattusid morfoloogia põhjal saadud määrangutega rohkem kui PacBio abil saadud määrangud (Illumina tuvastatud taksonite (enamasti liikide) osakaal oli keskmiselt 2,95% ja sugukondadel 7,3%, PacBio'ga oli liikidel kattuvuse osakaal 2,6% ja sugukondadel 0,33%). Võttes kokku kõik proovid ja alamproovid ning alad, on kattuvus PacBio ja morfoloogilisele määramistulemuse (enamasti liikide) vahel on 4,6% ning Illumina ja morfoloogilise määramistulemuste vahel on samuti 4,6%. Sugukondade tasemel oli kattuvuste osakaal morfoloogiliste ja PacBio määrangute vahel 2,9% ning morfoloogiliste ja Illumina määrangute vahel 11,4%. Selle põhjusteks võivad olla, et molekulaarseks määramiseks kasutati liiga väikseid mulla koguseid (2 g ja 0,2 g), liiga universaalsed praimerid ning referentsandmebaasides referentsjärjestuste puudumine (antud töös PacBio ja Illumina'ga leitud lestade OTU'dest ei õnnestunud 50% liigini määrata). Mulla mikro- ja mükobioloogilistes uuringutes on 2 g ja 0.2 g standardsed mullakogused kuid lestade uurimiseks on rohkem mulda vaja või siis tuleb lestad eelnevalt mullast eraldada. Meie tulemused näitasid, et PacBio'ga sekveneerides oli 0.2 g mullas vähem lestade OTU'sid kui 2 g mullas, samas aga Illumina'ga sekveneerides 0.2 g mullas oli rohkem lestade OTU'sid kui 2 g mullas. Võrreldes omavahel 18'nes Illumina'ga sekveneeritud proovis saadud taksonite arve 0,2 g ja 2 g alamproovides, saadi 0,2 g alamproovides võrreldes 2 g alamproovidega suuremad taksonite arvud 12 korral, kahel korral oli leitud taksonite võrdne arv. Samuti esineb suur erinevus kui liita kõik OTU'd kokku (0,2 g oli 75 ja 2 g 30 OTU't). Mis võiksid olla sellise tulemuse põhjused, ei saa nii väikese valimi põhjal järeldada. Kuna lestade järjestusi saadi proovidest oluliselt vähem kui näiteks mikroobide omi, võib järeldada, et nende sekveneerimine nõuab suuremat sekveneerimis sügavust, seda toetab ka kirjandus (Young & Hebert, 2022). Antud töös kasutati PacBio andmestiku puhul väiksemat sekveneerimissügavust (~1900 järjestust proovi kohta), kuna see on kallim võrreldes Illumina'ga (sügavus ~150,000 järjestust proovi kohta). Eeldati, et Illumina'ga saab rohkem lestade DNA signaale kätte, kuid määrangu täpsus ei ole nii hea kui PacBio'l, sest järjestuste pikkus on lühem. Samuti eeldati, et PacBio'ga on määrang parem vaatamata sellele, et on vähem signaale lestadelt. Vaatamata eeldustele oli

lesta OTU' de arv enam vähem võrdne, Illumina'ga leiti ainult 1 lesta OTU rohkem ning samuti olid taksonite määrangute täpsused suuremad (aga nii väikese valimi juures ei saa sellest kaugeleulatuvaid järeldusi teha). Erinevatel sekveneerimismeetoditel saadud taksonite määranguid ei kattunud omavahel oluliselt. Erinevus võib tulla praimeritest, sest kasutatud DNA oli täpselt sama. Võrreldes morfoloogilise määramisega võimaldas *meta*-triipkoodistamine tuvastada liike, mida Tullgreni aparraati kasutades kätte ei saa, kuna nad on väheliikuvad. Imilestade puhul on molekulaarne määramine osutunud tõhusaks, seda kinnitab nii antud töö, kui ka mujal tehtud tööd (Young et al, 2019). Morfoloogia põhjal tehtud töödele on ette heidetud seda, et nad alahindavad krüptilist liigirikkust (Skoracka et al, 2015), ka antud töös leiti, et ühele liigi nimele vastasid paljud eri OTU'd. Osad tööd käsitlevad varieeruvust krüptilise mitmekesisusena (Santos-Perdomo, et al 2024). Üldiselt on Folmeri COI praimerid hästi lestade mitmekesisust tuvastanud (Yu, et al. 2012; Young et al, 2012; Arribas, et al 2020; Santos-Perdomo, et al 2024). COI praimeritega on suur liigilist mitmekesisust tuvastatud nii partenogeneetiliselt sigivatel liikidel näitkes Tectocephidae sugukonna (sarvlest) esindajatel kui ka suguliselt sigivatel liikidel Ceratozetidae (sarvlest) ja Nanorchestidae (Endeostigmata) (Heethoff et al, 2007; Rosenberger et al, 2013; Schäffer et al, 2019). Näiteks Kanadast on teada ainult 2 Tectocephidae sugukonna liiki kuid molekulaarsel määramisel tuvastati sellest sugukonnast 131 eri OTU't (Young et al, 2019). Teised leiavad, et COI on liiga varieeruv (Capra et al, 2016; Lehmitz & Decker, 2017; Horton et al, 2017). On pakutud, et sarvlestade jaoks võiks tõhus marker olla 28S D3 fragment (Lehmitz & Decker, 2017).

DNA *meta*-triipkoodide põhjal leiti 4 Eestis varem tuvastamata liiki, ning lisandus 2 uut perekonda. Need on sarvlest *Scheloribates cf. clavilanceolatus*, pahklestad *Acalitus vaccinii* ja *Sierraphytoptus ambulans*, imilest *Steneotarsonemus laticeps* ja Endeostigmata perekond *Speleorchestes*. *Scheloribates clavilanceolatus* on Põhja-Ameerikas elav liik, keda Euroopast varem leitud pole (Subías, 2022). Tema kirjeldus (Ewing, 1907) on väheinformatiivne ning jätab palju ruumi interpretatsiooniks, selle töö käigus leitud isendi (joonis 14) tunnused sobisid antud kirjeldusega. Võrreldes leiu DNA järjestust *Scheloribates clavilanceolatus* järjestusega (Young et al, 2019) BOLD'i andmebaasi otsingut kasutades on nende sarnasuseks 97%. *Acalitus vaccinii* on Põhja-Ameerikast pärit mustikal parasiteeriv liik. Oma looduslikust areaalist väljapoole on

teda leitud ainult Lõuna-Aafrikast (Craemer, 2018), seega on tegemist antud liigi esmaleiuga Euroopast. *Sierraphytoptus ambulans* on metsmaasikal parasiteeriv liik, kelle lähimad leiud on Leningradi oblastist ja Soomest (Chetverikov & Sukhareva, 2009). *Steneotarsonemus laticeps* on polüfaag, kes meil kasvavatest taimedest parasiteerib nartsissidel (Messelink & van Holstein-Saj, 2007). Tema lähimad leiud on Poolast (Labanowski et al, 1990).



Joonis 14. Esmaleid Euroopast sarvlest *Scheloribates cf. clavilanceolatus* (pildi autorid Märt Rahi & Kaarel Sammet).

Lestade DNA referentsjärjestuste raamatukogu täiendamine on oluline (Young & Hebert, 2022). sarnasele tõdemusele on jõudnud (Koblmüller et al, 2024), et lestade taksonoomiline esindatus referentsandmebaasis BOLD on väike (Koblmüller et al, 2024). Lisaks referentsjärjestute puudumisele, esines andmebaasis Genbank vananenud taksonoomiat ja sünonüümide kasutamist, mis raskendab mõnevõrra andmete analüüsi, eriti kui eelteadmised lestade süstemaatikast on

vähesed või puuduvad, näiteks selts Sarcoptiformes on tänapäeval Oribatida (sarvlestad), sugukond Steganacaridae on Phthiracaridae, Hemileiidae on Scheloribatidae ja Camisiidae on Crotoniidae (Schatz et al, 2011), röövlesta perekond *Lysigamasus* on *Paragamasus* (Beaulieu et al, 2011), imilest *Eriophyes padi* on *Phyllocoptes eupadi* (Stalažs & Turka, 2019). Sarvlest *Scheloribates initialis* on *Hemileius initialis*, *Eniochthonius minutissimus* on *Hypochothoniella minutissima*, *Steganacarus csiszarae* on *Atropacarus csiszarae* ja *Steganacarus carinatus* on *Tropacarus carinatus* (Schatz et al, 2011). *Phthiracarus borealis* peetakse tänapäeval liigiks, mis hõlmab tegelikult mitut erinevat liiki (Weigmann, 2006; Niedbała, 2011).

4.4. Tulevikuvaade

Lestade DNA triipkoodide kättesaamiseks tuleks täiendavaid katseid teha. Tuleks proovida suurema DNA puhtuse tagamist, proovida neid eelnevalt enne DNA eraldust purustada või pikendada DNA eraldusaega. DNA kättesaamist võiks soodustada lestade leotamine destilleeritud vees pärast piirituses olekut, olenevalt suuruselt mõned minutid (üleliigsest piiritusest vabanemiseks). *Meta*-triipkoodistamise efektiivsust saaks suurendada kui selle asemel, et DNA'd otse mullast eraldada, võiks lestad ekstraheerida eelnevalt mullast ja siis saadud isendid *meta*-triipkoodistada. Referentsjärjestuste puudumisele oleks lahendus ise lokaalsete referentsandmestiku loomine ja referentsandmebaasi täiendamine. Selleks, et teha kaugemale ulatuvaid järeldusi tuleb antud teemat edasi uurida ja teha täiendavad katsed.

Kokkuvõte

Mullas elavad lesti on seni nende väikese suuruse ja määramise keerukuse tõttu puudulikult uuritud. Molekulaarsete meetodide rakendamine lestateaduses annab täiendavat teavet, mida morfoloogilise meetodeid kasutades ei saa (näiteks võimaldavad määrata noorjärke ja röövlesta isaseid ning tuvastada krüptilisi liike). DNA *meta*-triipkoodistamisel on märkimisväärne potentsiaal läbi viia ulatuslikke ja ülemaailmseid mullafauna uuringuid, teostada seiret, hinnata ajalisi muutusi ning koguda teavet levikumustrite kohta. Kuid selleks, et DNA *meta*-triipkoodistamine oleks efektiivne, on vaja teha eeltööd – lesti triipkoodistada ning seeläbi täiendada referentsandmebaase kohalike andmetega. Üks osa antud lõputööst oligi enda referentsandmestiku loomine, aga kahjuks ei jõutud neid andmeid enne magistr töö esitamist

analüüsida. Antud lõputöö põhieesmärk oli võrrelda erinevaid meetodikaid – molekulaarseid (kasutati PacBio ja Illumina sekveneerimistehnoloogiad ning olid 2 g ja 0,2 g alamproovid) ja morfoloogilist ning nende kombineeritud kasutamist. Kõigi kolme kasutatud meetodi tulemused erinesid üksteisest märgatavalt ning taksonite omavaheline kattuvus oli vähene. Kõikide meetodite ühiste liikide osakaal varieerus 2,3% kuni 4,6% vahel, keskmiselt 3,8%, Samuti ei esinenud eri sekveneerimismeetodidel saadud taksonite määrangute vahel olulist kattuvust (18,6%). PacBio'ga leiti liike, mida Tullgren'i aparaat eraldada ei võimalda (pähklesti). Enim leiti eri taksonid morfoloogilise määramise käigus (103), palju vähem kasutades molekulaarseid meetodeid. PacBio ja Illumina OTU'de arv oli peaaegu sama, vastavalt 62 ja 63. Molekulaarse määramise vähene OTU'de arv 2 g ja 0.2 g alamproovides oli mõnevõrra ootuspärane kuna kasutati universaalseid primereid väikeste mullakoguste peal, mis on tavaline lähenemine mulla mikrobioloogilistes uuringutes. Lisaks võib mullaproovides leiduvate lestade molekulaarne signaal olla nõrgenenud (loomade OTU'sid leiti PacBio'ga 3327 ning Illumina'ga 1765), kuna amplifitseerimisel kasutati universaalseid COI primereid. PacBio'ga sekveneerides leiti 0,2 g alamproovidest vähem OTU'sid kui 2 g proovides aga Illumina'ga sekveneerides oli tulemus huvitaval kombel vastupidine. Antud magistritööst järeldub, et lestakoosluste uurimiseks toimus kõige paremini morfoloogiline määramine (tuvastati kõige rohkem eri taksonid), kuid molekulaarsetel meetodidel on omad eelised (näiteks nad võimaldavad tuvastada liike, mida Tullgreni aparaat eraldada ei võimalda ning samaaegselt tuvastada ka teisi loomataksoneid peale lestade. Parima tulemuse annab nende kombineeritud kasutamine.

Summary

Soil-dwelling mites have been poorly studied due to their small size and complexity of identification. The application of molecular methods in acarology provides additional information that can't be obtained using morphological methods (for example, they enable the identification of juvenile stages and Mesostigmata males, as well as the detection of cryptic species). DNA metabarcoding has great potential for conducting large scale and global research on soil fauna, to enable monitoring and assessment of temporal changes and to collect information on distribution patterns. However, for DNA metabarcoding to be effective, preliminary work is required, involving DNA barcoding of mites and creation of a reference

library that is complemented with local data. One aspect of present study involved creation of own reference data but unfortunately it was not possible to analyze all data before submitting the master's thesis. The main goal of the present study was to compare different methodologies - molecular (PacBio and Illumina sequencing technologies with 2 g and 0.2 g subsamples) and morphological method and their combined application. The results obtained from all three methods showed considerable differences with minimal overlap between taxa. The proportion of shared species among all methods ranged from 2.3% to 4.6%, averaging 3.8%. With PacBio sequencing taxa (such as Eriophyoidea) were detected that can't be extracted with Tullgren funnel. The highest number of different taxa were identified using morphological identification (103), significantly fewer were identified by molecular methods. The number of OTUs obtained by using PacBio and Illumina sequencing was almost identical (62 and 63, respectively). The relatively low number of OTUs detected in the 2 g and 0.2 g subsamples using molecular methods was as anticipated due to the use of universal primers on small quantities of soil, which is a standard approach in soil microbiological research. Additionally, the molecular signals of mites present in soil samples might have been diluted (as 3327 animal OTUs were detected with PacBio and 1765 with Illumina), due to usage of universal COI primers during the amplification process. When sequencing with PacBio, fewer OTUs were found in the 0.2 g subsamples compared to the 2 g samples, but interestingly, the opposite was true for Illumina sequencing. This thesis concludes that morphological identification proved to be the most efficient method for studying mite communities (identifying the highest number of different taxa). However, molecular methods have their own advantages, such as the ability to detect species that can't be extracted using the Tullgren funnel and simultaneously detecting other non-mite animal taxa. The best results are yielded by their combined usage.

Tänuõnad

Tahaksin südamest tänada oma juhendajaid Sten Anslani ja Kaarel Sammetit toetava suhtumise, soovitude ja paranduste eest. Aitäh, et olete olnud alati nii abivalmid ja lasknud mul teha seda, mis mind tõesti väga huvitab. See on olnud imeline teadmistepagasi kasvamise teekond. Minu siirad tänuõnad mu vennale Silver Varuskile (aitäh, et Sa alati olemas oled, usud minusse ja toetad minu ettevõtmisi). Minu tänuõnad lähevad veel Manikandan Ariyanile, kes aitas

laboritöödega ja Rasmus Puusepale, kes oli alati laboris väga abivalmis, Kadri Runnelile, tänu kelle leidsin oma põhijuhendaja. Olen lõputult tänulik Heli Kirikule mitmesuguse abi, nõuannete ja toetuse eest. Tahaksin tänada ka oma sõpru (tähestikulises järjekorras) Anne-Liia Maidot, Daria Panasiuki, Koen Plankenit, Maitrii Oleskit, Marlen Laanepit ja Mylene Martinezit nende motiveerivate sõnade, ühiste seikluste, jalutuskäikude ja raamatukogus veedetud tundide eest! Aitäh, et tegite minu ülikoolis veedetud teekonna ilusamaks. Elagu sõprus ja lestateadus!

Kasutatud kirjandus

Abeynayake, S. W., Fiorito, S., Dinsdale, A., Whattam, M., Crowe, B., Sparks, K., Campbell, P. R., Gambley, C. (2021). A rapid and cost-effective identification of invertebrate pests at the borders using MinION sequencing of DNA barcodes. *Genes*, 12(8), 1138.

Anslan, S., Tedersoo, L. (2015). Performance of cytochrome c oxidase subunit I (COI), ribosomal DNA Large Subunit (LSU) and Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in DNA barcoding of Collembola. *European Journal of Soil Biology*, 69, 1-7.

Anslan, S., Bahram, M., Hiiesalu, I., Tedersoo, L. (2017). PipeCraft: Flexible open-source toolkit for bioinformatics analysis of custom high-throughput amplicon sequencing data. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e234-e240.

Antil, S., Abraham, J. S., Sripoorna, S., Maurya, S., Dagar, J., Makhija, S., Bhagat, P., Gupta, R., Sood, U., Lal, R., Toteja, R. (2023). DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. *Molecular Biology Reports*, 50(1), 761-775.

Arribas, P., Andújar, C., Hopkins, K., Shepherd, M., Vogler, A. P. (2016). Metabarcoding and mitochondrial metagenomics of endogean arthropods to unveil the mesofauna of the soil. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(9), 1071-1081.

Arribas, P., Andújar, C., Moraza, M. L., Linard, B., Emerson, B. C., Vogler, A. P. (2020). Mitochondrial metagenomics reveals the ancient origin and phylodiversity of soil mites and provides a phylogeny of the Acari. *Molecular Biology and Evolution*, 37(3), 683-694.

Barcode of Life Data System (2024). Kodulehekülg kättesaadaval
<https://www.boldsystems.org/> (külastatud 15.04.2024).

Baumann, J. (2023). An update on the knowledge about scutacarid mites as phoronts and inquilines. *Acarologia*, 64(1), 3-17.

Beaulieu, F., Dowling, A. P., Klompen, H., de Moraes, G. J., Walter, D. E. (2011). Superorder Parasitiformes Reuter, 1909. Kogumikus: Zhang, Z.-Q.(toim.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*, 3148(1), 123-128.

Behan-Pelletier, V. M. (1999). Oribatid mite biodiversity in agroecosystems: role for bioindication. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1-3), 411-423.

Behan-Pelletier, V., Lindo, Z. (2023). Oribatid Mites: Biodiversity, Taxonomy and Ecology. CRC Press, London, 508 lk.

Ben-David, T., Melamed, S., Gerson, U., Morin, S. (2007). ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 41, 169-181.

Besser, J., Carleton, H. A., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R. L., Trees, E. (2018). Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(4), 335-341.

- Bochkov, A. V.** (2008). Origin and evolution of parasitism in mites of the infraorder Eleutherengona (Acari: Prostigmata). Report I. Lower Raphignathae. *Parazitologiya*, 42(5), 337-359.
- Bolton, S. J., Chetverikov, P. E., Ochoa, R., Klimov, P. B.** (2023). Where Eriophyoidea (Acariformes) belong in the tree of life. *Insects*, 14(6), 527.
- Brasier, M. J., Wiklund, H., Neal, L., Jeffreys, R., Linse, K., Ruhl, H., Glover, A. G.** (2016). DNA barcoding uncovers cryptic diversity in 50% of deep-sea Antarctic polychaetes. *Royal Society Open Science*, 3(11), 160432.
- Brower, A. V.** (2006). Problems with DNA barcodes for species delimitation: 'ten species' of *Astrartes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperidae). *Systematics and Biodiversity*, 4(2), 127-132.
- Brussaard, L.** (1997). Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *AMBIO*, 26(8), 563–570.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P.** (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583.
- Capra, E., Giannico, R., Montagna, M., Turri, F., Cremonesi, P., Strozzi, F., Leone, P., Gandini, G., Pizzi, F.** (2016). A new primer set for DNA metabarcoding of soil Metazoa. *European Journal of Soil Biology*, 77, 53-59.
- Chac, L. D., Thinh, B. B.** (2023). Species Identification through DNA Barcoding and Its Applications: A Review. *Biology Bulletin*, 50(6), 1143-1156.
- Chetverikov, P. E., Sukhareva, S. I.** (2009). A revision of the genus *Sierraphytoptus* Keifer 1939 (Eriophyoidea, Phytoptidae). *Zootaxa*, 2309(1), 30-42.

Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., Lim, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2259-2261.

Coleman, D. C., Callaham, M. A., Crossley Jr., D. A. (2017). *Fundamentals of Soil Ecology: Edition 3*. Academic Press, London, 376 lk.

Collins, R. A., Cruickshank, R. H. (2013). The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 969-975.

Comtet, T., Sandionigi, A., Viard, F., Casiraghi, M. (2015). DNA (meta) barcoding of biological invasions: a powerful tool to elucidate invasion processes and help managing aliens. *Biological Invasions*, 17, 905-922.

Coons, L. B., Rothschild, M. (2008). Mites (Acari). Raamatus: J. L. Capinera (toim.), *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht, 4346 lk.

Craemer, C. (2018). First record, current status, symptoms, infested cultivars and potential impact of the blueberry bud mite, *Acalitus vaccinii* (Keifer) (Prostigmata: Eriophyidae) in South Africa. *Acarologia*, 58(3), 735-745.

Dalton, D. L., de Bruyn, M., Thompson, T., Kotzé, A. (2020). Assessing the utility of DNA barcoding in wildlife forensic cases involving South African antelope. *Forensic Science International: Reports*, 2, 100071.

Dawan, J., Ahn, J. (2022). Application of DNA barcoding for ensuring food safety and quality. *Food Science and Biotechnology*, 31(11), 1355-1364.

Donoso, D. A., Johnston, M. K., & Kaspari, M. (2010). Trees as templates for tropical litter arthropod diversity. *Oecologia*, 164, 201-211.

Eisenstein, M. (2023). Illumina faces short-read rivals. *Nature Biotechnology*, 41(1), 3-5.

Eitminaviciute, I. (2003). Soil mites of Lithuania. (Acari) Catalogue. Institute of Ecology of Vilnius University, Vilnius, 167 lk.

Engel, M. S., Ceriaco, L. M. P., Daniel, G. M., Dellapé, P. M., Löbl, I., Marinov, M., Reis, R. E., Young, M. T., Dubois, A., Agarwal, I., Lehmann, P. A., Alvarado, M., Alvarez, N., Andreone, F., Araujo-Vieira, K., Ascher, J. S., Baêta, D., Baldo, D., Bandeira, S. A., Barden, P., Barrasso, D. A., Bendifallah, L., Bockmann, F. A., Böhme, W., Borkent, A., Brandão, C. R. F., Busack, S. D., Bybee, S. M., Channing, A., Chatzimanolis, S., Christenhusz, M. J. M., Crisci, J. V., D'Elía, G., Da Costa, L. M., Davis, S. R., De Lucena, C. A. S., Deuve, T., Elizalde, S. F., Faivovich, J., Farooq, H., Ferguson, A. W., Gippoliti, S., Gonçalves, F. M. P., Gonzalez, V. H., Greenbaum, E., Hinojosa-Díaz, I. A., Ineich, I., Jiang, J., Kahono, S., Kury, A. B., Lucinda, P. H. F., Lynch, J. D., Malécot, V., Marques, M. P., Marris, J. W. M., McKellar, R. C., Mendes, L. F., Nihei, S. S., Nishikawa, K., Ohler, A., Orrico, V. G. D., Ota, H., Paiva, J., Parrinha, D., Pauwels, O. S. G., Pereyra, M. O., Pestana, L. B., Pinheiro, P. D. P., Prendini, L., Prokop, J., Rasmussen, C., Rödel, M.-O., Rodrigues, M. T., Rodríguez, S. M., Salatnaya, H., Sampaio, Í., Sánchez-García, A., Shebl, M. A., Santos, B. S., Solórzano-Kraemer, M. M., Sousa, A. C. A., Stoev, P., Teta, P., Trape, J.-F., Van-Dúnem Dos Santos, C., Vasudevan, K., Vink, C. J., Vogel, G., Wagner, P., Wappler, T., Ware, J. L., Wedmann, S., Zacharie, C. K. (2021). The taxonomic impediment: A shortage of taxonomists, not the lack of technical approaches. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 193(2), 381–387.

Ewing, H. E. (1907). New Oribatidae. *Psyche*, 14, 111-115.

Floyd, R., Lima, J., Dewaard, J., Humble, L., Hanner, R. (2010). Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. *Biological Invasions*, 12, 2947-2954.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.

Frøslev, T. G., Kjøller, R., Bruun, H. H., Ejrnæs, R., Brunbjerg, A. K., Pietroni, C., Hansen, A. J. (2017). Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. *Nature Communications*, 8(1), 1188.

Gan, H., Zak, D. R., Hunter, M. D. (2019). Scale dependency of dispersal limitation, environmental filtering and biotic interactions determine the diversity and composition of oribatid mite communities. *Pedobiologia*, 74, 43-53.

Geller, J., Meyer, C., Parker, M., Hawk, H. (2013). Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), 851-861.

Gorini, T., Mezzasalma, V., Deligia, M., De Mattia, F., Campone, L., Labra, M., Frigerio, J. (2023). Check your shopping cart: DNA barcoding and mini-barcoding for food authentication. *Foods*, 12(12), 2392.

Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PloS One*, 9(2), e87624.

Hakimzadeh, A., Abdala Asbun, A., Albanese, D., Bernard, M., Buchner, D., Callahan, B., Caporaso, J. G., Curd, E., Djemiel, C., Brandström Durling, M., Elbrecht, V., Gold, Z., Gweon, H. S., Hajibabaei, M., Hildebrand, F., Mikryukov, V., Normandeau, E., Özkurt, E., Palmer, J. M., Pascal, G., Porter, T. M., Straub, D., Vasar, M., Větrovský, T., Zafeiropoulos, H., Anslan, S. (2023). A pile of pipelines: An overview of the bioinformatics software for metabarcoding data analyses. *Molecular Ecology Resources*. 1–17.

Hardulak, L. A., Morinière, J., Hausmann, A., Hendrich, L., Schmidt, S., Doczkal, D., Müller, J., Hebert, P. D. N., Haszprunar, G. (2020). DNA metabarcoding for biodiversity monitoring in a national park: Screening for invasive and pest species. *Molecular Ecology Resources*, 20(6), 1542-1557.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., De Waard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 96-99.

Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817.

Heethoff, M., Domes, K., Laumann, M., Maraun, M., Norton, R. A., Scheu, S. (2007). High genetic divergences indicate ancient separation of parthenogenetic lineages of the oribatid mite *Platynocheilus peltifer* (Acari, Oribatida). *Journal of Evolutionary Biology*, 20(1), 392-402.

Hernandes, F. A., de Castro, T. M. M. G., Venancio, R. (2015). Prostigmata (Acari: Trombidiformes) as Biological Control Agents. Raamatus: D. Carrillo, G. J. de Moraes, & J. E. Peña (toim.). Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms, Springer, New York, 329 lk.

Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. E., Kim, K.-J., Kress, W. J., Schneider, H., van AlphenStahl, J., Barrett, S. C. H., van den Berg, C., Bogarin, D., Burgess, K. S., Cameron, K. M., Carine, M., Chacón, J.,

Clark, A., Clarkson, J. J., Conrad, F., Devey, D. S., Ford, C. S., Hedderson, T. A. J., Husband, B. C., Kelly, L. J., Kesanakurti, P. R., Kim, J. S., Kim, Y.-D., Lahaye, R., Lee, H.-L., Long, D. G., Madriñán, S., Maurin, O., Meusnier, I., Newmaster, S. G., Park, C.-W., Percy, D. M., Petersen, G., Richardson, J. E., Salazar, G. A., Savolainen, V., Seberg, O., Wilkinson, M. J., Yi, D.-K., Little, D. P. (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.

Horton, D. J., Kershner, M. W., Blackwood, C. B. (2017). Suitability of PCR primers for characterizing invertebrate communities from soil and leaf litter targeting metazoan 18S ribosomal or cytochrome oxidase I (COI) genes. *European Journal of Soil Biology*, 80, 43-48.

Hoy, M.A. (2008). Soil Mites (Acari: Oribatida and Others). Raamatus: J. L. Capinera (toim.), Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht, 4346 lk.

Huhta, V. (2016). Catalogue of the Mesostigmata mites in Finland. *Memoranda: Societatis pro Fauna et Flora Fennica*, 92. 129–148.

International Code of Zoological Nomenclature Online (2024). Kodulehekülg kättesaadaval: <https://code.iczn.org/appendices/appendix-b-general-recommendations/?frame=1> (külastatud 22.05.2024).

Irinyi, L., Lackner, M., De Hoog, G. S., Meyer, W. (2016). DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. *Fungal Biology*, 120(2), 125-136.

Kaminskienė, E., Radzijeuskaja, J., Gričiuvienė, L., Stanko, M., Snegiriovaitė, J., Mardosaitė-Busaitienė, D., Paulauskas, A. (2023). Molecular identification and phylogenetic analysis of Laelapidae mites (Acari: Mesostigmata). *Animals*, 13(13), 2185.

Karg, W. (1993). Raubmilben: Acari (Acarina), Milben, Parasitiformes (Anactinochaeta), Cohors Gamasina Leach; 4 Tabellen. G. Fischer, 524 lk.

Kethley, J. (1990). Acarina: Prostigmata (Actenidida). Raamatus: D. L. Dindal (toim.), Soil Biology Guide. Wiley, New York, 1376 lk.

Khaustov, A. A. (2008). Mites of the family Scutacaridae of Eastern Palaearctic. Akadempriodyka, Kiev, 291 lk.

Klompen, J. S. H. (2000). Prelarva and larva of *Opilioacarus (Neocarus) texanus* (Chamberlin and Mulaik) (Acari: Opilioacarida) with notes on the patterns of setae and lyrifissures. *Journal of Natural History*, 34(10), 1977-1992.

Kobl Müller, S., Resl, P., Klar, N., Bauer, H., Zangl, L., Hahn, C. (2024). DNA Barcoding for Species Identification of Moss-Dwelling Invertebrates: Performance of Nanopore Sequencing and Coverage in Reference Database. *Diversity*, 16(4), 196.

Koehler, H. H. (1999). Predatory mites (Gamasina, Mesostigmata). Raamatus: M. G. Paoletti (toim.), Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes: Practical Use of Invertebrates to Assess Sustainable Land Use. Elsevier, 460 lk.

Krantz, G.W., Walter, D.E. (2009). Oviposition and Life Stages. Raamatus: Krantz, G.W. & Walter, D.E. (toim.), A Manual of Acarology (3 trükk). Texas Tech University Press, Lubbock, 807 lk.

Kress, W. J., Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2761-2762.

Kvist, S. (2013). Barcoding in the dark?: A critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(1), 39-45.

Kõljalg, U., Nilsson, H. R., Schigel, D., Tedersoo, L., Larsson, K.-H., May, T. W., Taylor, A. F. S., Jeppesen, T. S., Frøslev, T. G., Lindahl, B. D., Põldmaa, K., Saar, I., Suija, A., Savchenko, A., Yatsiuk, I., Adojaan, K., Ivanov, F., Piirmann, T., Pöhönen, R., Zirk, A., Abarenkov, K. (2020). The taxon hypothesis paradigm—on the unambiguous detection and communication of taxa. *Microorganisms*, 8(12), 1910.

Labanowski, G. S., Labanowska, B. H., Suski, Z. W. (1990). New species of mites (Acarina) in the fauna of Poland. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 373, 9–17.

Lehmitz, R., Decker, P. (2017). The nuclear 28S gene fragment D3 as species marker in oribatid mites (Acari, Oribatida) from German peatlands. *Experimental & Applied Acarology*, 71(3), 259.

Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J. T., Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10, 1-14.

Lilleskov, E. A., Bruns, T. D. (2005). Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs. *Mycologia*, 97, 762–769.

Lindquist, E. E., Krantz, G. W., Walter, D. E. (2009). Order Mesostigmata. Raamatus: Krantz, G.W. & Walter, D.E. (toim.), A Manual of Acarology (3 trükk). Texas Tech University Press, Lubbock, 807 lk.

Linn, C., O'Malley, A., Khatri, K., Wright, E. M., Sebah, D., Grbić, M., Kowal, K., Chruszcz, M. (2024). Microscopic Menaces: The Impact of Mites on Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3675.

Liu, M., Clarke, L. J., Baker, S. C., Jordan, G. J., Burridge, C. P. (2020). A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. *Ecological Entomology*, 45(3), 373-385.

Liu, Y., Xu, C., Dong, W., Yang, X., Zhou, S. (2021). Determination of a criminal suspect using environmental plant DNA metabarcoding technology. *Forensic Science International*, 324, 110828.

Logsdon, G. A., Vollger, M. R., Eichler, E. E. (2020). Long-read human genome sequencing and its applications. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 597-614.

Maraun, M., Schatz, H., Scheu, S. (2007). Awesome or ordinary? Global diversity patterns of oribatid mites. *Ecography*, 30(2), 209-216.

Marra, J. L., Edmonds, R. L. (2005). Soil arthropod responses to different patch types in a mixed-conifer forest of the Sierra Nevada. *Forest Science*, 51(3), 255-265.

Marx, V. (2023). Method of the year: long-read sequencing. *Nature Methods*, 20(1), 6-11.

Messelink, G. J., van Holstein-Saj, R. (2007). Biological control of the bulb scale mite *Steneotarsonemus laticeps* (Acari: Tarsonemidae) with *Neoseiulus barkeri* (Acari: Phytoseiidae) in amaryllis. *IOBC WPRS Bulletin*, 30(5), 81.

Moritz, M. (1970): Revision von *Suctobelba trigona* (Michael, 1888). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin*, 46, 135-166.

Mwale, M., Dalton, D. L., Jansen, R., De Bruyn, M., Pietersen, D., Mokgokong, P. S., Kotzé, A. (2017). Forensic application of DNA barcoding for identification of illegally traded African pangolin scales. *Genome* 60(3), 272-284.

Niedbala, W. (2011). Ptyctimous mites (Acari: Oribatida) of the Palaearctic Region. Systematic part. *Fauna Mundi* vol.4 Natura optima dux foundation, Varssav, 472 lk.

Niemann, H. J., Bezeng, B. S., Orton, R. D., Kabongo, R. M., Pilusa, M., van der Bank, M. (2022). Using a DNA barcoding approach to facilitate biosecurity: Identifying invasive alien

macrophytes traded within the South African aquarium and pond plant industry. *South African Journal of Botany*, 144, 364-376.

Norton, R. A., Ermilov, S. G. (2014). Catalogue and historical overview of juvenile instars of oribatid mites (Acari: Oribatida). *Zootaxa*, 3833(1), 1-132.

OConnor, B. (2009). Astigmata. Raamatus: Krantz, G.W., Walter, D.E. (toim.), A Manual of Acarology (3 trükk). Texas Tech University Press, Lubbock, 807 lk.

Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H. B. A., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M. O., Lahti, L., McGlenn, D., Ouellette, M-H., Cunha, E. R., Smith, T., Stier, A., Ter Braak, C. J. F., Weedon, J. (2022). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-4.
Kättesaadaval: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (külastatud 25.04.2024).

Oliveira, I. C. S. de, Martin, J. F., Tixier, M. S., Paula, D. P., Navia, D. (2022). Unveiling the diet of predatory mites through DNA metabarcoding—can abiotic factors affect prey detectability?. *Zoosymposia*, 22, 98-100.

Oliveros, J. C. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.
Kättesaadaval: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (külastatud 25.04.2024).

Ondrejicka, D. A., Locke, S. A., Morey, K., Borisenko, A. V., Hanner, R. H. (2014). Status and prospects of DNA barcoding in medically important parasites and vectors. *Trends in Parasitology*, 30(12), 582-591.

PacBio infoleht. Kättesaadaval:

<https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Sequel-II-System-v8.0-and-SMRT-Link-v8.0-Technical-Overview-Customer-Training.pdf> (külastatud 12.04.2024).

Paradis, E., Schliep, K. (2019). Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35, 526-528.

Pepato, A. R., Klimov, P. B. (2015). Origin and higher-level diversification of acariform mites—evidence from nuclear ribosomal genes, extensive taxon sampling, and secondary structure alignment. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 1-20.

Pfingstl, T., Baumann, J., Lienhard, A. (2019a). The Caribbean enigma: The presence of unusual cryptic diversity in intertidal mites (Arachnida, Acari, Oribatida). *Organisms Diversity and Evolution*, 19, 609–623.

Pfingstl, T., Lienhard, A., Baumann, J. (2019b). New and cryptic species of intertidal mites (Acari, Oribatida) from the Western Caribbean – an integrative approach. *International Journal of Acarology*, 45, 10–25.

Pfingstl, T., Bardel-Kahr, I., Schäffer, S. (2023). The Caribbean intertidal mite *Alismobates inexpectatus* (Acari, Oribatida), an unexpected case of cryptic diversity?. *Organisms Diversity & Evolution*, 23(4), 811-832.

Porter, T. M., Hajibabaei, M. (2018). Automated high throughput animal CO1 metabarcoding classification. *Scientific Reports*, 8(1), 4226.

R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Kättesadaval: <https://www.R-project.org/>.

Ratnasingham, S., Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364.

Recuero, E., Etzler, F. E., Caterino, M. S. (2023). Most soil and litter arthropods are unidentifiable based on current DNA barcode reference libraries. *Current Zoology*, zoad051.

Rhoads, A., Au, K. F. (2015). PacBio sequencing and its applications. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13(5), 278-289.

Rosenberger, M., Maraun, M., Scheu, S., & Schaefer, I. (2013). Pre-and post-glacial diversifications shape genetic complexity of soil-living microarthropod species. *Pedobiologia*, 56(2), 79-87.

Roslin, T., Somervuo, P., Pentinsaari, M., Hebert, P. D. N., Agda, J., Ahlroth, P., Anttonen, P., Aspi, J., Blagoev, G., Blanco, S., Chan, D., Clayhills, T., deWaard, J., deWaard, S., Elliot, T., Elo, R., Haapala, S., Helve, E., Ilmonen, J., Hirvonen, P., Ho, C., Itämies, J., Ivanov, V., Jakovlev, J., Juslén, A., Jussila, R., Kahana, J., Kaila, L., Kaitila, J.-P., Kakko, A., Kakko, I., Karhu, A., Karjalainen, S., Kjaerandsen, J., Koskinen, J., Laasonen, E. M., Laasonen, L., Laine, E., Lampila, P., Miller, M., Miskie, R., Muinonen, A., Mukkala, V.-M., Naik, S., Nikolova, N., Nupponen, K., Ovaskainen, O., Österblad, I., Paasivirta, L., Pajunen, T., Parkko, P., Paukkunen, J., Penttinen, R., Perez, K., Pohjoismäki, J., Prosser, S., Raekunnas, M., Rahulan, M., Rannisto, M., Ratnasingham, S., Raukko, P., Rinne, A., Rintala, T., Romo, S. M., Salmela, J., Salokannel, J., Savolainen, R., & Schulman, L. Rintala, T., Romo, S. M., Salmela, J., Salokannel, J., Savolainen, R., Schulman, L., Sihvonen, P., Soliman, D., Sones, J., Steinke, C., Ståhls, G., Tabell, J., Tiusanen, M., Várkonyi, G., Vesterinen, E. J., Viitanen, E., Vikberg, V., Viitasaari, M., Vilen, J., Warne, C., Wei, C., Winqvist, K., Zakharov, E., Mutanen, M. (2022). A molecular-based identification resource for the arthropods of Finland. *Molecular Ecology Resources*, 22(2), 803-822.

Ross, G. M., Horn, S., Macdonald, C. A., Powell, J. R., Reynolds, J. K., Ryan, M. M., Cook, J. M., Nielsen, U. N. (2020). Metabarcoding mites: Three years of elevated CO₂ has no effect on oribatid assemblages in a Eucalyptus woodland. *Pedobiologia*, 81, 150667.

Salmane, I., Brumelis, G. (2010). Species list and habitat preference of Mesostigmata mites (Acari, Parasitiformes) in Latvia. *Acarologia*, 50(3), 373-394.

Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Sherry, S. T., Yankie, L., Karsch-Mizrachi, I. (2024). GenBank 2024 update. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D134-D137.

Santos-Perdomo, I., Suárez, D., Moraza, M. L., Arribas, P., Andújar, C. (2024). Towards a Canary Islands barcode database for soil biodiversity: revealing cryptic and unrecorded mite species diversity within insular soils. *Biodiversity Data Journal*, 12, 1-31.

Schatz, H., Behan-Pelletier, V. (2008). Global diversity of oribatids (Oribatida: Acari: Arachnida). *Hydrobiologia*, 595, 323–328.

Schatz, H., Behan-Palletier, V.M., OConnor, B. M., Norton, R.A (2011). Suborder Oribatida van der Hammen, 1968. Kogumikus: Zhang, Z.-Q.(toim.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*, 3148(1), 141-148.

Schneider, G. F., Dekker, C. (2012). DNA sequencing with nanopores. *Nature Biotechnology*, 30(4), 326-328.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M.-J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A. R., Buyck, B., Cai, L., Cai, Q., Cardinali, G., Chaverri, P., Coppins, B. J., Crespo, A., Cubas, P., Cummings, C., Damm, U., de Beer, Z. W., de Hoog, G. S., Del-Prado, R., Dentinger, B., Diéguez-Uribeondo, J., Divakar, P. K., Douglas, B., Dueñas, M., Duong, T. A., Eberhardt, U., Edwards, J. E., Elshahed, M. S., Fliegerova, K., Furtado, M., García, M. A., Ge, Z.-W., Griffith, G. W., Griffiths, K., Groenewald, J. Z., Groenewald, M., Grube, M., Gryzenhout, M., Guo, L.-D., Hagen, F., Hambleton, S., Hamelin, R. C., Hansen, K., Harrold, P., Heller, G., Herrera, C., Hirayama, K., Hirooka, Y., Ho, H.-M., Hoffmann, K., Hofstetter, V., Högnabba, F., Hollingsworth, P. M., Hong, S.-B., Hosaka, K., Houbraken, J., Hughes, K., Huhtinen, S., Hyde, K. D., James, T., Johnson, E. M., Johnson, J. E., Johnston, P. R., Jones, E. B. G., Kelly, L. J., Kirk, P. M., Knapp, D. G., Kõljalg, U., Kovács, G. M., Kurtzman, C.

P., Landvik, S., Leavitt, S. D., Ligginstoffer, A. S., Liimatainen, K., Lombard, L., Luangsa-ard, J. J., Lumbsch, H. T., Maganti, H., Maharachchikumbura, S. S. N., Martin, M. P., May, T. W., McTaggart, A. R., Methven, A. S., Meyer, W., Moncalvo, J.-M., Mongkolsamrit, S., Nagy, L. G., Nilsson, R. H. Niskanen, T., Nyilasi, I., Okada, G., Okane, I., Olariaga, I., Otte, J., Papp, T., Park, D., Petkovits, T., Pino-Bodas, R., Quaedvlieg, W., Raja, H. A., Redecker, D., Rintoul, T. L., Ruibal, C., Sarmiento-Ramírez, J. M., Schmitt, I., Schüßler, A., Shearer, C., Sotome, K., Stefani, F. O. P., Stenroos, S., Stielow, B., Stockinger, H., Suetrong, S., Suh, S.-O., Sung, G.-H., Suzuki, M., Tanaka, K., Tedersoo, L., Telleria, M. T., Tretter, E., Untereiner, W. A., Urbina, H., Vágvölgyi, C., Vialle, A., Vu, T. D., Walther, G., Wang, Q.-M., Wang, Y., Weir, B. S., Weiß, M., White, M. M., Xu, J., Yahr, R., Yang, Z. L., Yurkov, A., Zamora, J.-C., Zhang, N., Zhuang, W.-Y., Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.

Schäffer, S., Kerschbaumer, M., Koblmüller, S. (2019). Multiple new species: Cryptic diversity in the widespread mite species *Cymbaeremaeus cymba* (Oribatida, Cymbaeremaeidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 135, 185-192.

Skoracka, A., Magalhaes, S., Rector, B. G., Kuczyński, L. (2015). Cryptic speciation in the Acari: a function of species lifestyles or our ability to separate species?. *Experimental and Applied Acarology*, 67, 165-182.

Stalažs, A., Turka, I. (2019). Eriophyoid mites (Acari: Prostigmata: Eriophyoidea) of Latvia: an annotated checklist. *Zootaxa*, 4629(2), 211-236.

Stork, N. E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth?. *Annual Review of Entomology*, 63, 31-45.

Subías, L. S. (2022). Listado sistemático, sinonímico y biogeográfico de los ácaros oribátidos (Acariformes, Oribatida) del mundo (excepto fósiles). *Monografías electrónicas S.E.A.*, nº 12, 537 lk.

Sugimoto, T., Nagata, J., Aramilev, V. V., Belozor, A., Higashi, S., McCullough, D. R. (2006). Species and sex identification from faecal samples of sympatric carnivores, Amur leopard and Siberian tiger, in the Russian Far East. *Conservation Genetics*, 7, 799-802.

Zhang, H., Bu, W. (2022). Exploring large-scale patterns of genetic variation in the COI gene among Insecta: Implications for DNA barcoding and threshold-based species delimitation studies. *Insects*, 13(5), 425.

Zhang, Z. Q., Fan, Q. H., Pesic, V., Smit, H., Bochkov, A. V., Khaustov, A. A., Baker, A., Wohltmann, A., Wen, T., Amrine, J.W., Beron, P., Lin, J., Gabrys, G., Husband, R. (2011). Order Trombidiformes Reuter, 1909. Kogumikus: Zhang, Z.-Q. (toim.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa* 3148. 129-138.

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045-2050.

Tedersoo, L., Albertsen, M., Anslan, S., Callahan, B. (2021). Perspectives and benefits of high-throughput long-read sequencing in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(17), e00626-21.

Urbanowski, C. K., Turczański, K., Andrzejewska, A., Kamczyc, J., Jagodziński, A. M. (2022). Which soil properties affect soil mite (Acari, Mesostigmata) communities in stands with various shares of European ash (*Fraxinus excelsior* L.)?. *Applied Soil Ecology*, 180, 104633.

Valière, N., Fumagalli, L., Gielly, L., Miquel, C., Lequette, B., Poulle, M.-L., Weber, J.-M., Arlettaz, R., Taberlet, P. (2003). Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation*, 6, 83–92.

van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30(9), 418-426.

Vincent, A. T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A. I., Charette, S. J. (2017). Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 60-71.

Walter, D. E. (1988). Predation and mycophagy by endeostigmatid mites (Acariformes: Prostigmata). *Experimental & Applied Acarology*, 4(2), 159-166.

Walter, D. E., Ikonen, E. K. (1989). Species, guilds, and functional groups: taxonomy and behavior in nematophagous arthropods. *Journal of Nematology*, 21(3), 315.

Walter, D. E., Krantz, G. W. (2009). Collecting, Rearing, and Preparing Specimens. Raamatus: Krantz, G.W., Walter, D.E. (toim.), A Manual of Acarology (3 trükk). Texas Tech University Press, Lubbock, 807 lk.

Walter, D. E., Lindquist, E. E., Smit, I. M., Cook, D. R., Krantz, G. W. (2009). Order Trombidiformes. Raamatus: Krantz, G.W. & Walter, D.E. (toim.), A Manual of Acarology (3 trükk). Texas Tech University Press, Lubbock, 807 lk.

Walter, D. E., Proctor, H. C. (2013). Mites: ecology, evolution and behaviour. (2 trükk). Springer Science & Business Media, Berlin, 494 lk.

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267.

Weigand, H., Weiss, M., Cai, H., Li, Y., Yu, L., Zhang, C., Leese, F. (2017). Deciphering the origin of mito-nuclear discordance in two sibling caddisfly species. *Molecular Ecology*, 26(20), 5705-5715.

Weigand, H., Beermann, A. J., Čiampor, F., Costa, F. O., Csabai, Z., Duarte, S., Geiger, M. F., Grabowski, M., Rimet, F., Rulik, B., Strand, M., Szucsich, N., Weigand, A. M., Willassen, E., Wyler, S. A., Bouchez, A., Borja, A., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Ferreira, S., Dijkstra, K.-D. B., Eisendle, U., Freyhof, J., Gadawski, P., Graf, W., Haegerbaeumer, A., van der Hoorn, B. B., Japoshvili, B., Keresztes, L., Keskin, E., Leese, F., Macher, J. N., Mamos, T., Paz, G., Pešić, V., Pfannkuchen, D. M., Pfannkuchen, M. A., Price, B. W., Rinkevich, B., Teixeira, M. A. L., Várbíró, G., Ekrem, T. (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of the Total Environment*, 678, 499-524.

Weigmann, G. (2006). Hornmilben (Oribatida). Die Tierwelt Deutschlands, 76. Teil. Goecke & Evers, Keltern, 520 lk.

Weiss, M., Weigand, H., Weigand, A. M., Leese, F. (2018). Genome-wide single-nucleotide polymorphism data reveal cryptic species within cryptic freshwater snail species—The case of the *Ancylus fluviatilis* species complex. *Ecology and Evolution*, 8(2), 1063-1072.

Westfall, K. M., Therriault, T. W., Abbott, C. L. (2020). A new approach to molecular biosurveillance of invasive species using DNA metabarcoding. *Global Change Biology*, 26(2), 1012-1022.

Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag, New York.
Kättesaadaval: <https://ggplot2.tidyverse.org/>.

Whitford, W. G., Santos, P. F. (1980). Arthropods and detritus decomposition in desert ecosystems. Raamatus: D. L. Dindal (toim.), Soil Biology as Related to Land Use Practices. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C, 889 lk.

Xu, S. Z., Li, Z. Y., Jin, X. H. (2018). DNA barcoding of invasive plants in China: A resource for identifying invasive plants. *Molecular Ecology Resources*, 18(1), 128-136.

Young, M. R., Behan-Pelletier, V. M., Hebert, P. D. (2012). Revealing the hyperdiverse mite fauna of subarctic Canada through DNA barcoding. *PLoS One*, 7(11), e48755.

Young, M. R., Proctor, H. C., Dewaard, J. R., Hebert, P. D. (2019). DNA barcodes expose unexpected diversity in Canadian mites. *Molecular Ecology*, 28(24), 5347-5359.

Young, M. R., deWaard, J. R., & Hebert, P. D. (2021). DNA barcodes enable higher taxonomic assignments in the Acari. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13.

Young, M. R., Hebert, P. D. N. (2022). Unearthing soil arthropod diversity through DNA metabarcoding. *PeerJ*. 10, e12845.

Yu, D. W., Ji, Y., Emerson, B. C., Wang, X., Ye, C., Yang, C., Ding, Z. (2012). Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4), 613-623.

Yu, J., Wu, X. I., Liu, C., Newmaster, S., Ragupathy, S., Kress, W. J. (2021). Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111691.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sirle Varusk,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Morfoloogilisel vs. molekulaarsel meetodil mullas elavate lestade (Acari) identifitseerimine”, mille juhendajad on Sten Anslan ja Kaarel Sammet, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Sirle Varusk

23.05.2024