

TARTU JAAN POSKA GÜMNAASIUM

MIHKEL SUIJA

12.C KLASS

HARILIKU KORPSAMBLIKUGA (*XANTHORIA PARIETINA* (L.) TH. FR.) ASSOTSIEERUVATE FOTOBIONTIDE MITMEKESISUS EESTIS rDNA ITS JÄRJESTUSTE PÕHJAL

JUHENDAJAD: AVE SUIJA (PhD), LAURI MÄLLO

SISSEJUHATUS

Käesolev uurimistöö käsitleb fotobiontide varieeruvust ühe konkreetse samblikuliigi piires ning seoseid hariliku korpsambliku fotobiondi liigi/genotüübi ja elupaiga ning substraadi vahel. Uurimisobjektiks on autor valinud hariliku korpsambliku (*Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.), kuna see on üks tavalisemaid Eestis esinevaid samblikke ja teda võib leida kasvamas erinevates elupaikades: metsades, parkides ja rannikualadel, ning väga erinevatel substraatidel, nagu nt puukoorel, kividel, sammalde peal ja taimejäänustel (Randlane 1994: 379).

Käesoleva uurimistöö eesmärk oli määrata neljast erinevast elupaigast ja kolmelt erinevalt substraadilt korjatud 24 hariliku korpsambliku isendi fotobiondi DNA ja konkreetsete geenijärjestuste (rDNA ITS) abil selgitada fotobiontide liigid. Selleks eraldati samblikust kogu DNA ning uuritav fotobiondi geenilõik paljundati rohevetika-spetsiifiliste praimerite abil, kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodit. Seejärel paljundatud geenilõigud sekveneeriti, et määrata geenijärjestused. Saadud tulemusi võrreldi geenipangas (Genbank 2017) talletatud geenijärjestustega.

Käesolevas töös püstitati järgnevad hüpoteesid:

1. Eestis kasvav harilik korpsamblik assotsieerub mitme erineva *Trebouxia* liigiga;
2. erinevas elupaigas moodustab harilik korpsamblik talluse erineva *Trebouxia* liigi või selle geneetilise variandiga;
3. *Trebouxia* liik või selle geneetiline variant on erineval substraadil kasvaval harilikus korpsamblikus erinev.

Töö teema oli valitud huvist molekulaarbioloogia ja samblike vastu. Samuti andis töö teostamine autorile võimaluse tutvuda lihtsamate molekulaarbioloogiliste meetoditega ja anda talle tulevikuperspektiivis olulisi uusi teadmisi. Ka ei olnud hariliku korpsambliku fotobionte varem molekulaarsete meetoditega Eestis uuritud, mistõttu andis uurimistöö olulist teavet samblike ökoloogiast Eestis. Varasemalt on hariliku korpsambliku fotobiondi varieeruvust uurinud Honegger kolleegidega (Honegger jt 2013).

Uurimistöö on jaotatud nelja suurde peatükki. Teoreetilise osa esimeses peatükis tutvustatakse sambliku kui eluvormi olemust. Teises peatükis käsitletakse hariliku korpsambliku morfoloogiat, tema kasvukeskkonda ja fotobionti. Kolmandas peatükis kirjeldatakse samblike korjamist, nende säilitamist, elupaiku, kust neid korjati, meetoodika valikut ja tehtud katsete käiku. Viimases peatükis tuuakse välja saadud tulemused ja järeldused neljast erinevast elupaigast korjatud 24 hariliku korpsambliku fotobiondi DNA järjestuste võrdlemisel.

Rahaline toetus saadi Eesti Teadusagentuurilt Noore uurija stipendiumi näol (lisa 5). Täna Tartu Ülikooli ökoloogia ja maateaduste instituudi mükoloogia õppetooli teadurit Heidi Tamme ja molekulaarbioloogia laboranti Rasmus Puuseppa juhendamise eest laboris.

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	1
MÕISTED	4
1. SAMBLIK KUI SÜMBIONTNE ELUVORM	5
1.1. Sambliku olemus	5
1.2. Sambliku morfoloogia.....	6
1.3. Sambliku fotobiont.....	7
2. HARILIK KORPSAMBLIK (<i>Xanthoria parietina</i>).....	8
2.1. Hariliku korpsambliku morfoloogia	8
2.2. Hariliku korpsambliku fotobiont ja selle morfoloogia	9
2.3. <i>Trebouxia</i> erinevate liikide omadused.....	9
3. METOODIKA	10
3.1. Samblike kogumine, säilitamine ja DNA eraldamiseks ettevalmistamine	10
3.2. Sambliku fotobiondi liigi määramine rDNA ITS järjestuste alusel	10
3.3. DNA eraldamine harilikust korpsamblikust.....	11
3.4. PCR ja geelelektroforees	12
3.5. DNA puhastamine, sekveneerimine ja DNA järjestuste analüüs	13
4. TULEMUSED JA ARUTELU.....	13
4.1. Geelelektroforees	13
4.2. Fotobiondid harilike korpsamblike tallustes.....	14
4.2.1. Fotobiondi liikide ja epifüütse vetika morfoloogilised erinevused	18
4.2.2. Fotobiondi liikide erinevad geneetilised variandid ja intronid proovis MS1	18
4.3. Fotobiondi seos elupaiga ja substraadiga.....	20
KOKKUVÕTE	20
ABSTRACT	21
KASUTATUD MATERJALID	22
LISAD	24
Lisa 1. Laboris töötamise kuupäevad.....	24
Lisa 2. Viie polümeraasi ahelreaktsiooni geelelektroforeesi fotod	25
Lisa 3. <i>Trebouxia arboricola</i> erinevus teistest <i>Trebouxia</i> liikidest	27
Lisa 4. Fülogeneesipuu jaoks kasutatud geenipanga variandid	28
Lisa 5. Noore uurija stipendium.....	29

MÕISTED

Bp (ingl *basepair*) – aluspaar, DNA ja RNA ehitusüksus

DNA – pärilikku informatsiooni säilitav aine, mis asub iga raku rakutuumas, kromosoomides

DNA polümeraas – ensüüm, mis sünteesib uut DNA-d

Geelektroforees – meetod, mille käigus erineva pikkusega DNA fragmendid eraldatakse üksteisest elektriväljas

Indel – organismi geenis toimunud insertioon või deletsioon

Intron – geenis olev DNA järjestus, millel puudub kodeeriv funktsioon

ITS (ingl *internal transcribed spacer*) – sisemine transkribeeritav speisser – DNA lõik ribosoomi väikest ja suurt subühikut kodeerivas geenis, millelt RNA-d ei kopeerita. ITS lõik on kõige enam sekveneerimisel kasutatav müko- ja fotobiondi DNA lõik

Klaad – taksonoomiline rühm, mis hõlmab viimast ühist eellast (liiki) ja kõiki selle eellase järeltulijaid. Klaad saab olla ainult monofüleetiline

Kloroplast – taimeraku organell, milles toimub fotosüntees

Nukleotiidid – orgaanilised molekulid, mis moodustavad nukleiinhappeid (DNA ja RNA)

PCR (ingl *polymerase chain reaction*) e polümeraasi ahelreaktsioon – meetod kindla DNA piirkonna paljundamiseks (amplifitseerimiseks)

Praimer (ingl *primer*) – lühike DNA lõik, mida on vaja, et DNA polümeraas saaks kinnituda spetsiifilisele DNA piirkonnale

Puhver – lahus, millega tagatakse lahuse stabiilne pH

Pürenoid – kloroplastis olev organell, kus toimub fotosünteesiks vajaliku CO₂ fikseerimine

rDNA e ribosomaalne DNA – DNA järjestus, mis kodeerib ribosomaalset RNA-d. Esineb organismide genomis mitmes korduses ja seda kasutatakse laialdaselt organismide põlvnemissuhete selgitamiseks

Sekveneerimine e järjestusanalüüs – meetod, mille käigus tehakse kindlaks DNA lõigu nukleotiidide järjestus

Soreed – samblike vegetatiivse paljunemise vahend, mis koosneb paarist fotobiondi rakust ja neid ümbritsevatest seeneniitidest

1. SAMBLIK KUI SÜMBIONTNE ELUVORM

1.1. Sambliku olemus

Samblik on sümbiootiline liitorganism, mis koosneb fotosünteesivast komponendist e fotobiondist, kelleks võib olla kas rohevetikas või tsüanobakter, ja seene komponendist e mükobiondist. Mõnikord nimetakse sambliku sümbioosi tema mükobiondi dominantsuse tõttu ka kontrollitud parasitismiks – mükobiont on võimeline fotobionti kontrollima, reguleerides tema paljunemist, sealjuures viis, kuidas mükobiont seda teeb, pole päriselt selge (Nash 2008: 1). Siinse töö kontekstis käsitletakse fotobiondi ja mükobiondi suhet sümbioosina.

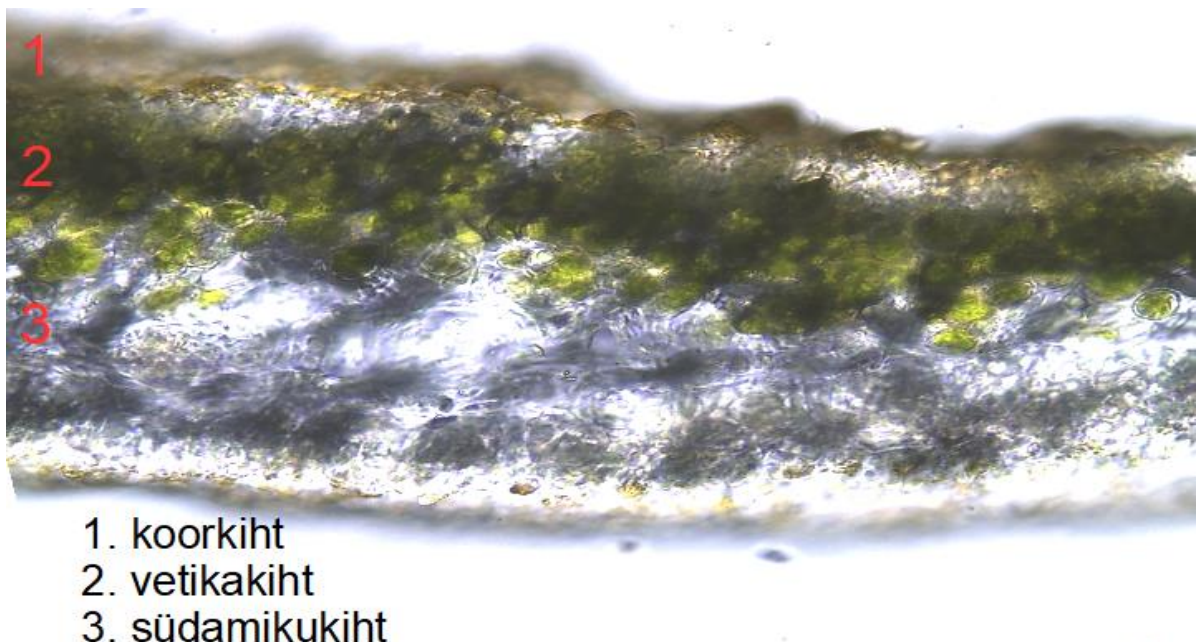
Mükobiondi ja fotobiondi sümbioos toimib, kuna fotobiont on võimeline fotosünteesima ja seeläbi varustama mükobionti toitainetega, samas pakub mükobiont fotobiondile teatavat kaitset konkurentide ja liigse valguse eest ning toodab fotobiondilt saadud süsivesikutest eluks vajalikke orgaanilisi aineid ja sekundaarselt olulistena nn samblikuaineid, mis kaitsevad samblikku erinevate keskkonnategurite eest. Sellise sümbioosi tulemusena on samblik üsna aeglaselt kasvav ja väikese konkurentsivõimega, kuid on see-eest väga vastupidav ekstreemsete olude suhtes. Seetõttu on võimalik leida samblike kasvamas piirkondades, kus enamik taimi ei suuda kasvada, nt kõrgmägedes, kõrbes ning tundras (Jüriado jt 2004: 8). Samas on samblikud väga tundlikud keskkonna saastuse suhtes, sest erinevalt taimedest on samblike tallused ajas püsivad, mistõttu on saasteainetel võimalik samblike sees kuhjuda. Seetõttu on neid võimalik kasutada keskkonna indikaatoritena (Randlane 1994: 22–23).

Protsessi, mille tulemusel moodustub samblik, nimetatakse lihheniseerumiseks. Lihheniseerumise toimumiseks peavad keskkonnas olema olemas mõlemad biondid. Paljud samblikud paljunevad vegetatiivselt (nt soreedide või isiididega), mis tähendab, et mõlemad biondid levivad koos. Kõige sagedamini toimub see tuules levimise kaudu, aga näiteks ka putukate abil. Samas võib sambliku mükobiont levida ka eostega, mis tähendab, et uue organismi moodustamiseks peavad mõlemad biondid kokku saama. Fotobiont paljuneb sümbioosis ainult vegetatiivselt, sugulise paljunemise kohta on andmeid vähe ja kindlat viisi, kuidas fotobiont mükobiondiga kokku saab, pole teada. (Randlane 1994: 16–19)

1.2. Sambliku morfoloogia

Lihheniseerumise tulemusena moodustub püsiva struktuuriga tallus e sambliku keha, mille moodustavad seeneniidistik ja fotobiondi rakud. Tallus võib olla nii oma suuruselt, värvilt kui kujult isenditi (ja liigiti) väga erinev. Näiteks talluse värvus võib olla ühe perekonna piires nii kollane, punane, pruun, must kui ka hall. Värvu määrab samblike pealmine, ainult seeneniitidest koosnev kiht, koorkiht. Ka viisid, kuidas samblikud on kinnitunud substraadi külge, võivad olla erinevad. Samblik võib olla kas osaliselt substraadi sees (pisisamblikud) või lõdvalt substraadile kinnitunud (suursamblikud). (Jüriado jt 2004: 10)

Samblike tallused on valdavalt mitmekihilised, kus igal kihil on oma funktsioon (joonis 1). Kõige pealmine kiht on enamikel samblikel koorkiht, mis kujutab endast tihedalt läbipõimunud seeneniidistikku. See kiht kaitseb samblikke kahjulike keskkonnategurite eest, nt liigse valguse eest. Koorkihi all paikneb fotobiondi kiht, mis koosneb ainult fotobiondi rakkudest ja kus toimub fotosüntees. Selle kihi paksust on mükobiondil võimalik reguleerida vastavalt keskkonnatingimustele, mõjutades fotobiondi paljunemist. Kolmas ja kõige paksem kiht koosneb hõredalt paigutatud seeneniidistikust, mida nimetatakse südamikukihiks ning mille peamiseks ülesandeks on tagada samblike vee- ja gaasivahetus. Selle kihi all võib asuda ka alumine koorkiht, mis kaitseb sambliku alapoolt erinevate keskkonnaohtude eest. (Jüriado jt 2004: 10)



Joonis 1. Hariliku korpsambliku talluse ristlõige (autori foto).

1.3. Sambliku fotobiont

Fotobiondid on mikroskoopilised sambliku sümbiondid, mis osalevad samblikus fotosünteesijatena (foto 1). Fotobiondid asuvad tavaliselt talluste ülemistes kihtides (joonis 1), tagades sellega endale kõige optimaalsema valguse kättesaadavuse. Seejuures saavad fotobiondid jagada seeneniitide kaudu fotosünteesist saadud toitaineid mükobiondiga. Mükobiont kontrollib osaliselt fotobiondi elutegevust, nt on mükobiont võimeline reguleerima fotobiondi paljunemist. (Nash 2008: 10)

Sambliku fotobiont on tavaliselt kas rohevetikas või tsüanobakter. Rohevetikaid esineb sümbioosis tsüanobakteritest sagedamini, sest rohevetikad on oma nõudmistes universaalsemad. Nt piisab rohevetikale fotosünteesimiseks ainult veeaurust, kuid tsüanobakter vajab selle toimumiseks pidevalt vedelast veest ümbritsetud keskkonda. Üks suurimaid erinevusi rohevetika ja tsüanobakteri sümbioosi vahel on ka see, et rohevetikas sünteesib fotosünteesi käigus suhkuralkohole, tsüanobakter aga glükoosi. Ka on tsüanobakter erinevalt rohevetikast võimeline õhulämmastikku fikseerima, tagades seeläbi lämmastikuühenditega varustatuse. (Nash 2008: 10–11)

Sagedasemaid fotobiondid on rohevetikate perekonnad *Trebouxia* ja *Trentepohlia* ning tsüanobakterite perekond *Nostoc* (Nash 2008: 9). Fotobiondid levivad erinevates biotoopides ja nende keskkonnatingimuste nõuded varieeruvad, mistõttu võib teistsuguste tingimustega biotoopides kasvavates samblikes olla erinev fotobiont (Nash 2008: 2). Ka valib mükobiont fotobionte nende omaduste pärast: mõned fotobiondid on teatud tingimustel efektiivsemad fotosünteesijad kui teised, kuid on samas tundlikumad mõnede teiste keskkonnategurite, nt kuivuse suhtes. Arvatakse, et mida väiksem on mükobiondi selektiivsus fotobiondi osas, seda levinum see samblik on. Viisi, kuidas mükobiont fotobionti valib, ei teata. (Nash 2008: 10)

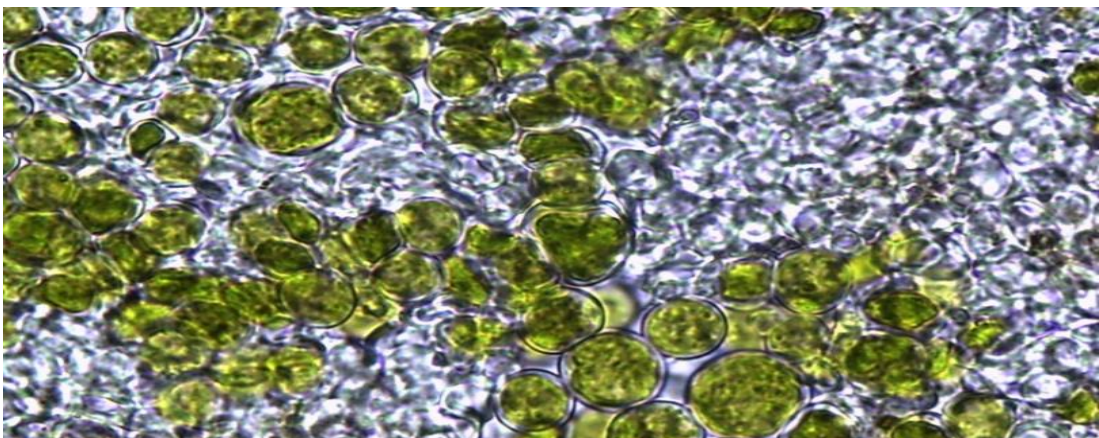


Foto 1. Fotobiondid perekonnast *Trebouxia* seeneniitide vahel (autori foto; pildidel olevate rohevetikate läbimõõt on 8–16 µm).

2. HARILIK KORPSAMBLIK (*Xanthoria parietina*)

2.1. Hariliku korpsambliku morfoloogia

Harilik korpsamblik on lehtja tallusega samblik, mis on kergesti äratuntav oma talluse peal asuvate kausjate moodustiste e apoteetsiumite tõttu. Harilik korpsamblik paljuneb ainult suguliselt – apoteetsiumites valmivad seeneeosed, millega sambliku mükobiont levib. Selle sambliku värvus varieerub kollasest kollakasoranžini, kuid on leitud ka punaseid, rohelisi ja halle isendeid (foto 2). Korpsamblikule annab tema iseloomuliku värvuse pigment parietiin. Hariliku korpsambliku talluse suurus on tavaliselt 1–10 cm, kõrgus 1–5 mm. (Randlane 1994: 379)

Harilik korpsamblik ei ole oma substraadi suhtes valiv: ta võib kasvada nii kividel, puukoorel kui ka puidul, samuti inimtekkelistel substraatidel (nt betoonpostidel). Hariliku korpsambliku isendid on väga vastupidavad õhusaastuse suhtes, mistõttu on nad ühed levinumad samblikud inimasustusega aladel. Siiski eelistavad nad kasvada valgus-, soolade- ja lämmastikurikas piirkonnas, mistõttu on neid võimalik kõige rohkem leida soolase vee äärest. (Randlane 1994: 379)

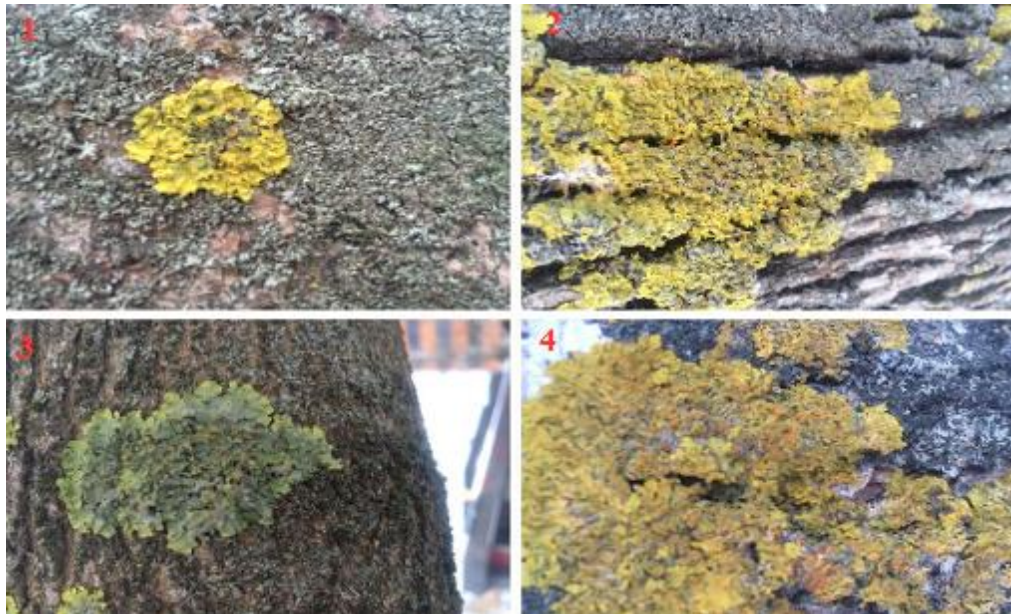


Foto 2. Erinevad hariliku korpsambliku isendid erinevatel substraatidel (autori fotod; 1 – graniidil, 2 – harilikul vahtral, 3 – harilikul tammel, 4 – harilikul männil)

2.2. Hariliku korpsambliku fotobiont ja selle morfoloogia

Hariliku korpsambliku fotobiont kuulub perekonda *Trebouxia* (foto 1). Harilikust korpsamblikust on molekulaarsete meetoditega määratud kaks liiki, *Trebouxia arboricola* (perekonna tüüpliik) ja *T. decolorans* (Honegger, Nyati, Werth 2013). Ametlikult on perekonnas *Trebouxia* kirjeldatud 23 liiki, aga liikide arv on tõenäoliselt suurem (Guiry 2016). *Trebouxia* on võimeline kasvama looduses iseseisvalt, kuid vabalt elavana on teda leitud väga harva. Nende paljunemine vabas looduses toimub autospooride e viburiteta eostega, väga harva ka zoospooride e viburitega eostega. Zoospooridega võib *Trebouxia* paljuneda ka talluses, kuid seda on täheldatud väga harva. (Nash 2008: 17–20)

Fotobiont perekonnast *Trebouxia* on ainurakne ümara kujuga rohevetikas, mis sisaldab ühte tähekujulist kloroplasti, mille sees asub omakorda pürenoid. Pürenoidi funktsioon on hoida püsivat CO₂ kontsentratsiooni CO₂ fikseeriva ensüümi RuBisCO jaoks. (Nash 2008: 19–20) Sambliku talluses on *Trebouxia* liikumatu ja mükobiont on tema kloroplasti ning pürenoidi suurust võrreldes vabalt elava vormiga vähendanud. Rakutuum on sopistunud kloroplasti seinale. (Peksa, Škaloud 2008)

2.3. *Trebouxia* erinevate liikide omadused

Trebouxia erinevatel liikidel on erinevad füsioloogilised omadused. Paljud *Trebouxia* liigid kasvavad kiiremini, kui keskkonda on lisatud mitteorgaanilisi lämmastikuühendeid (NH₄NO₃ ja NaNO₃), nt *T. anticipata*, *T. gelatinosa* ja *T. magna* kasvavad kiiremini NH₄NO₃ olemasolul, *T. arboricola*, *T. pyriformis*, *T. excentrica*, *T. glomerata*, *T. crenulata* ja *T. italiana* kasvavad kiiremini NH₄NO₃ ja NaNO₃ olemasolul, kuid *T. flava* kasv ei sõltu mitteorgaaniliste lämmastikuühendite sisaldusest keskkonnas. (Archibald 1977)

In vitro tingimustes tehtud vaatlustel on selgunud, et *Trebouxia* kasv on parim glükoosi puhul. Samuti on teada, et *Trebouxia* osadel liikidel on erinevatel valguse intensiivsustel erinev glükoosi lagundamise võime. Nt *Trebouxia arboricola* ja *T. crenulata* kasvavad paremini valguse käes, aga *T. erici* kasvab paremini väiksema valguse intensiivsuse juures. (Archibald 1977) Ka võib fotobiondi valik sõltuda sambliku substraadist. Näiteks rant-sõõrsamblikud (*Protoparmeliopsis muralis*), mis kasvavad betoonil, võivad assotsieeruda rohkemate *Trebouxia* liikidega kui need isendid, mis kasvavad lubjakivil või graniidil. Graniidil ja lubjakivil kasvavatest rant-sõõrsamblikest on määratud ainult *T. incrustata*, samas kui betoonil kasvavatest on määratud *T. asymmetrica*, *T. gigantea* ja *T. incrustata*. (Guzow-Krzemińska 2006)

3. METOODIKA

3.1. Samblike kogumine, säilitamine ja DNA eraldamiseks ettevalmistamine

Töö hüpoteeside kontrollimiseks koguti 24 proovi neljast elupaigast: avatud keskkondadest, mere- ja mageveekogu äärest (Pärnu lahe ja Emajõe äärest), Tartu kesklinnast (Tähtvere pargist), kus saastuse hulk võib olla suurem, ning äärelinnast (Annelinnast), kus keskkonna saastatuse hulk võib olla väiksem. Igast elupaigast võeti kolm samblikutallust puukoore pealt (erinevatelt puuliikidelt) ja kolm samblikutallust betooni või graniidi pealt, vastavalt sellele, milline neist oli elupaigas olemas (tabel 2). Puudelt kogutud proove koguti koos substraaditükiga. Iga tallus pandi eraldi paberist volditud ümbriku, mille peale kirjutati: kogumise kuupäev, elupaik ja selle kirjeldus, substraat ja koordinaadid. Proovid koguti 12.08., 13.08., 30.08. ja 12.11.2016.

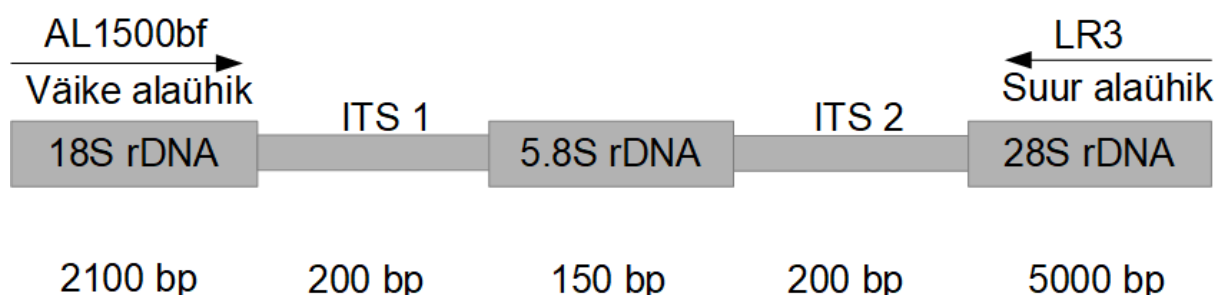
Pärast korjamist pandi korpsamblikud kaheks ööpäevaks kuivama, kust nad seejärel pandi ümbrikesse tagasi. Kuivatamise järel eraldati igast kogutud harilikust korpsamblikust väike osa tallusest ja pandi Eppendorfi reaktsioonituubi. Pärast iga eraldamist puhastati töövahendid etanooliga ja igale Eppendorfi tuubile ja paberhoidikule märgiti vastav järjekorranumber. Pärast fotobiondi liikide tuvastamist tehti erinevatest fotobiontidest ning puudelt korjatud samblike substraadi peal kasvavatest rohevetikatest valgusmikroskoobi all pildid (suurendus 630×). Uurimistöö teostamiseks korjatud hariliku korpsambliku talluseid hoitakse Tartu Ülikooli Loodusmuuseumi ja botaanikaia samblike kogus numbrite TU73156–TU73179 all.

3.2. Sambliku fotobiondi liigi määramine rDNA ITS järjestuste alusel

Sambliku fotobiondi määramine välistunnuste abil on keeruline ja ka sel juhul on võimalik kindlaks teha ainult fotobiondi perekond. Seetõttu on peaaegu ainuke viis sambliku fotobiondi liigi kindlaks tegemiseks võrrelda fotobiondi DNA järjestusi. Kogu DNA kättesaamiseks on erinevaid meetodeid, mis kõik eeldavad rakkude purustamist ning töötlemist erinevate keemiliste ainetega. Kuna siinse töö eesmärgiks oli kätte saada fotobiondi DNA, siis tuli huvipakkuvaid DNA geenilõike paljundada, kasutades selleks spetsiaalselt disainitud praimereid. Käesolevas uurimistöös kasutati rohevetika-spetsiifilisi praimereid (tabel 1), mis seonduvad rohevetika rDNA ITS piirkonda. See geenilõik on kõikides organismides oleva ribosomaalse DNA (rDNA) suure ja väikse alaühiku vahel paiknev speisser-piirkond (joonis 2), mida kasutatakse sageli seente ja vetikate liikide määramiseks. Teadaolevalt on selle geenilõigu ITS1 ja ITS2 piirkonnad mittekodeerivad ning seetõttu kõrge mutatsioonisagedusega. See võimaldab omakorda eristada ka lähedalt suguluses olevaid

liike. Lisaks on seda geenilõiku lihtne paljundada, kuna seda on genoomis paljudes kordustes.

Fotobiondi DNA lõikude nukleotiidsed järjestuste kindlaks tegemiseks e sekveneerimiseks tuli proovid saata sekveneerimisteenust teostavasse asutusse ning seejärel oli võimalik saadud järjestusi võrrelda geenipangas (Genbank 2017) talletatavate geenijärjestustega, et leida nende vahelisi sarnasusi ja erinevusi, eeldades et iga sekveneeritud DNA lõik vastas erinevale fotobiondi liigile. Pärast võrdlemist sai viia fotobiondi liigi vastavusse elupaiga ja substraadiga ja teha sellest järeldusi samblike fotobiondi ja substraadi ning elupaiga vahelistest seostest. Sekveneerimise tulemusena teada saadud DNA nukleotiidsed järjestused ehk sekvensid on kättesaadavad PlutoF andmebaasis (PlutoF 2017) ning nähtavad Eesti eElurikkuse (eElurikkus 2017) andmebaasis.



Joonis 2. Rohevetika ITS geenilõigu paiknemine genoomis, selle erinevate osade ligikaudsed pikkused ja töös kasutatud praimerite seondumine ITS lõigu külge

3.3. DNA eraldamine harilikust korpsamblikust

DNA eraldamiseks kasutati lüüsimetodit, mis on lihtsaim ja odavaim DNA eraldamise meetod. DNA eraldamine viidi läbi Tartu Ülikooli ökoloogia ja maateaduste instituudi mükoloogia õppetooli molekulaarbioloogia laboris (lisa 1). Kõigepealt pandi igasse Eppendorfi tuubi kaks steriliseeritud metallkuuli ja pandi proovid purustisse (Retsch MM 40) ning raputati 150 s, et purustada rakukestad. Seejärel segati proove 5 s Vortexiga (Vortex genie 2). Igasse Eppendorfi tuubi pipeteeriti 100 µl 10× lüüsi puhvrit (Solis Biodyne, Eesti), et lahustada rakumembraanid. Valkude lagundamiseks ja DNA püsijäämiseks lisati igasse Eppendorfi tuubi 2,5 µl valku lagundavat ensüümi proteinaas K (kontsentratsioon 20 mg/ml). Reaktsiooni kiirendamiseks pandi tuubid termostaati (Thermomixer comfort) ja hoiti temperatuuril 56 °C 15 h ja 15 minutit 98 °C. Seejärel proovid tsentrifugeeriti 120 s 8000 rpm (pööret sekundis), et vedelik koos DNA-ga jääks pinnale. Umbes 50–70 µl vedelat osa pipeteeriti uutesse Eppendorfi tuubidesse. PCR tegemiseks kasutati nii lahjendamata DNA-d kui ka kümnekordselt ülipuhta veega lahjendatud DNA lahust.

3.4. PCR ja geelelektroforees

PCR reaktsioon viidi läbi segus kogumahuga 25 µl, milles oli 5 µl HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis BioDyne, Eesti), 1 µl kumbagi rohevetika-spetsiifilist praimerit (tabel 1) LR3 (Friedl, Rokita 1997) ja AL1500bf (Friedl, Helms, Mayrhofer, Rambold 2001), 0,5–2 µl DNA lahust ning ülejäänud 16–17,5 µl ülipuhast vett. Tehti viis PCR reaktsiooni: esimene PCR reaktsioon viidi läbi lahjendamata DNA-ga, järgmisteks PCR reaktsioonideks kasutati 10× lahjendatud DNA-d (5 µl DNA lahust ja 45 µl ülipuhast vett), kuid kasutati erinevaid DNA koguseid: 0,5; 1 ja 2 µl DNA-d. Iga PCR reaktsiooni jaoks tehti üks lisaproov (kontrollproov, milles ei olnud DNA-d) potentsiaalse saastuse tuvastamiseks. PCR töösükkel koosneb korduvatest temperatuuri tõstmistest ja langetamisest, mille eesmärgiks on tagada korduv ensümaatiline protsess: DNA kaksikheeliksi lahtikeerdumine kõrgemal temperatuuril ja sellele järgnev lahti keerdunud ahelate paljundamine DNA polümeraasiga. Lõpuks langetatakse temperatuuri, nii et kaksikheeliksi lahtikeerdunud ahelad taas komplementaarsuspõhimõttel seonduvad. PCR tsükkel oli järgmine: 95 °C 15 min, 30 või 32 tsüklit 94 °C 40 s, 55 °C (kasutatud praimerite optimaalne seondumistemperatuur) 40 s; 72 °C 80 s ja viimaks 72 °C 10 min.

PCR produktide teke tehti kindlaks, lahutades kordistunud DNA fragmendid geelelektroforeesil (lisa 2). Selleks tehti 1% agarosgeel (1 g agarooosi ja 100 ml 1× TRIS-boraat-EDTA e TBE). Lahust kuumutati mikrolaineahjus kuni agarooosi lahustumiseni ning seejärel lisati segule 1 µl DNAGA seonduvat etiidumbromiidi, et UV-kiirguse toimel proovid helendama hakkaks. Segu valati seejärel alusesse, kus asusid „kammid“, mis segu tahkumisel geeli sisse augud jätavad ja kuhu kantakse uuritav proov. Segu tahkumisel kammid eemaldati ja tahkunud geel koos alusega pandi geelelektroforeesiaparaati, mis oli täidetud 1× TBE puhvriga. Kammidest tekkinud aukudesse kanti DNA proovid ning kontrollproov (5 µl). DNA järjestuse pikkuse hindamiseks kanti rea esimesse auku DNA suurusmarker (5 µl). Seejärel pandi masin tööle u 30 minutiks, mille jooksul DNA fragmendid elektriväljas üksteisest eraldusid. Masina töö lõppedes võeti geel masinast välja ja pandi UV kiirguse alla ja tehti geelist pilt.

Tabel 1. Fotobiondi DNA lõigu eraldamiseks kasutatud praimerite nukleotiitide arv ja järjestused

Praimeri nimi	Nukleotiitide arv	Nukleotiitide järjestused (5' ->3')
AL1500bf	19	GAT GCA TTC AAC GAG CCT A
LR3	17	CCG TGT TTC AAG ACG G

3.5. DNA puhastamine, sekveneerimine ja DNA järjestuste analüüs

DNA puhastamiseks e lisaainetest vabanemiseks pipeteeriti edukalt kordistunud DNA proovidesse 0,5 µl eksonukleas I ja 1 µl FastAP (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ja pandi proovid PCR masinasse järgmise seadistusega: 37 °C 45 min, 85 °C 15 min. Sekveneerimiseks ettevalmistamiseks pandi DNA produktid uutesse tuubidesse ja tehti uued 10× lahjendusega praimerite lahused. PCR produktid sekveneeriti firmas MacroGene Inc. (Amsterdam).

Fotobiondi DNA paljundatud proovide järjestuste mõlemad ahelad ühendati nn konsensusjärjestuseks, kasutades programmi Sequencher (Sequencher® version 5.4.6). Kui üks ahel oli kvaliteetne ja teine ahel oli mittekvaliteetne, siis kasutati edasises analüüsis ainult kvaliteetset ahelat (tabel 2). Saadud konsensus- ja üheaahelalisi järjestusi ning geenipangast saadud geenijärjestusi vaadeldi ja korrigeeriti programmis SEAVIEW Ver 4.6.1 (Gouy, Guindon, Gascuel 2010) ja lõigati ära 18S rDNA ja 28S rDNA piirkonnad. Uuritavaid ja geenipangast saadud referents- ehk võrdlusjärjestusi kõrvutati programmi MUSCLE (Edgar 2004) abil. Molekulaarse fülogeneesi uurimiseks rakendati suurima tõenäosuse (Maximum Likelihood) meetodit, kasutades GTR (General Time Reversible) mudelit, mis on kõikidest nukleotiidipõhist evolutsiooni hindavatest mudelitest kõige neutraalsem ja sõltumatum (Tavaré 1986). Klaadide toetuse hindamiseks kasutati kingapaela (bootstrapping) meetodit (100 kordust) ja kvaliteetsema tulemuse saamiseks kasutati ainult kaheaahelalisi (tabel 2) ning kõige kvaliteetsemaid üheaahelalisi proove (proovid 2 ja 5). Fülogeneesipuu juurimiseks lisati andmestikku viis geenipangast pärit kahe teise *Trebouxia* liigi – *T. impressa* Ahmadjian ja *T. gelatinosa* Ahmadjian ex Archibald geenijärjestust (lisa 4)

4. TULEMUSED JA ARUTELU

4.1. Geelelektroforees

Nelja polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) peale kokku saadi 24 positiivset tulemust (lisa 2). Esimesel PCR-l, kus kasutati lahjendamata DNA-d, õnnestusid ainult kaks proovi (MS4 ja MS14), mis oli tõenäoliselt tingitud sellest, et erinevad inhibeerivad ained (nt polüsahhariidid) võisid takistada PCR reaktsiooni toimumist (lisa 2 foto 1; pt 3.4). Järgmistel PCR-del kasutati lahjendatud DNA-d ning õnnestunud proovide hulk oli suurem. Proov MS1 oli geelelektroforeesil liikunud elektriväljas vähem, mistõttu võis oletada, et selle geenilõigu nukleotiidide arv pidi olema suurem (pt 4.2.2; lisa 2 foto 4).

Kahe DNA proovi (MS1 ja MS11) puhul amplifitseerus ühe geelelektroforeesi puhul kahe organismi DNA (geelil näha topelt-triibud ehk -bändid), kuid teisel geelelektroforeesil esinesid topeltbändid ainult ühel proovil (MS11), mistõttu proov MS11 ei olnud sekveneerimiseks

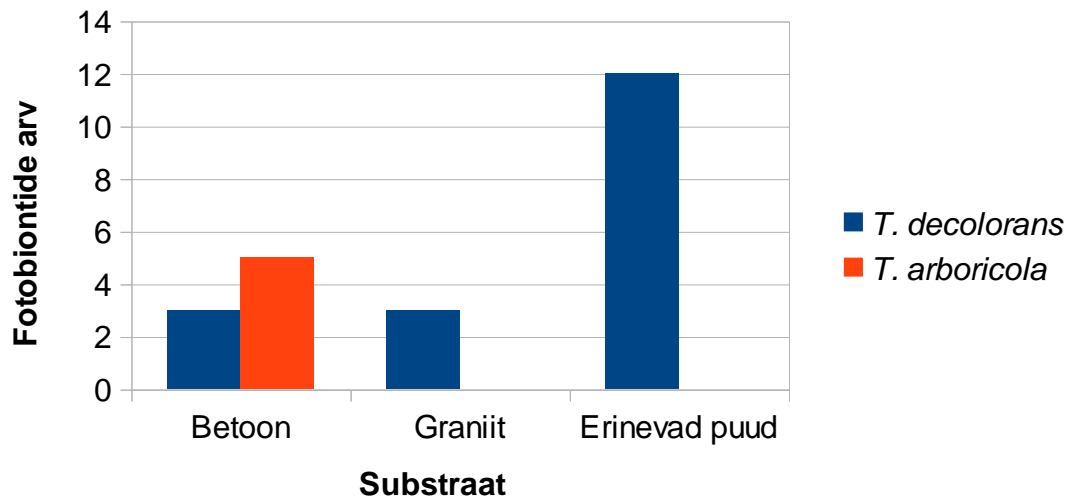
kasutatav (lisa 2 foto 3 ja 4). Topeltbändid võisid olla tingitud kahe erineva vetika olemasolust proovis, kuna kasutati vetikaspetsiifilisi praimereid. Samas võisid topeltbändid olla põhjustatud sellest, et proove ei võetud puhtalt ja teine „vetikas“ võis proovi sattuda samblikku ümbritsevast keskkonnast. Stereomikroskoobiga vaadeldes oli näha, et proovi MS1 sambliku lähedal kasvaski teine rohevetikas (foto 3) ning korratud DNA eraldusel proovis MS1 geelelektroforeesil topeltbändid puudusid (lisa 2 foto 4). Proovis MS11 ega selle läheduses aga ühtegi teist rohevetikat ei kasvanud ning ka DNA teistkordsel eraldusel esinesid topeltbändid (lisa 2 foto 4). Kirjanduses on viidatud võimalusele, et samblike tallustes võib samaaegselt elada kaks erinevat rohevetikast fotobionti, kellel on erinevad füsioloogilised omadused (Barreno jt 2011) või kes on sattunud sinna juhuslikult (Honegger jt 2013).

4.2. Fotobiondid harilike korpsamblike tallustes

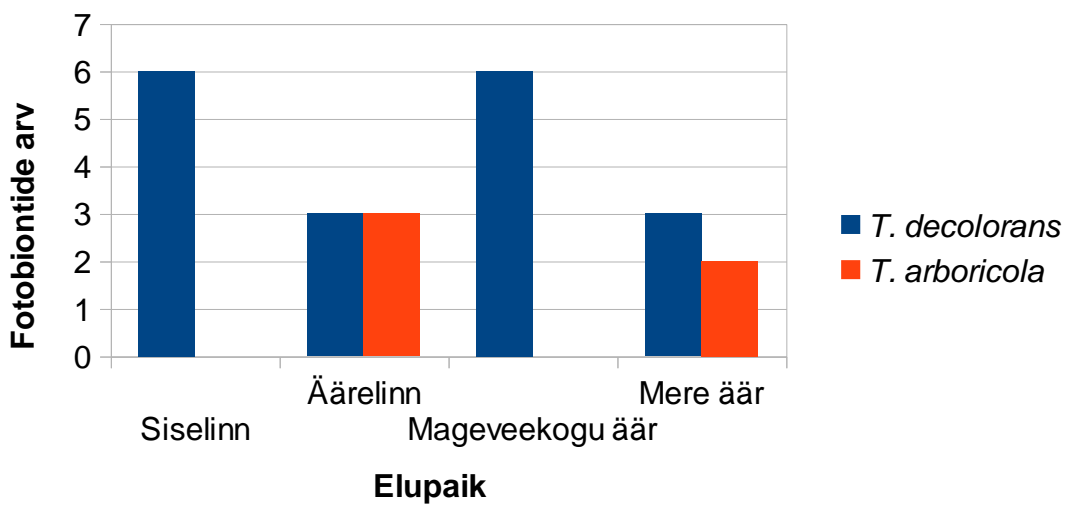
Proovide DNA järjestuste võrdlemisel geenijärjestuste andmebaasis (Genbank 2017) saadi kõigile proovidele vasteks vetikas perekonnast *Trebouxia*. DNA järjestuste võrdlemisel selgus, et Eestist kogutud harilikes korpsamblikes esinevad fotobiontidena kaks perekonda *Trebouxia* kuuluvat liiki: *Trebouxia arboricola* Puymaly ja *T. decolorans* Ahmadjian (tabel 2, joonis 3 ja 4). Neist *T. decolorans* oli sagedasem: see esines 18-s samblikutalluses ning *T. arboricola* ainult viies talluses. *Trebouxia arboricola* ja *T. decolorans* on Eesti eElurikkuse (eElurikkus 2017) andmebaasi andmetel Eestile esmamäärangud. Kirjanduse andmetel on mõlemad liike hariliku korpsambliku tallustest määratud, neist sarnaselt siinse tööga oli levinumaks liigiks *T. decolorans* (Honegger, Nyati, Werth 2013). *Trebouxia arboricola* geenijärjestused olid teistest *Trebouxia* liikide geenijärjestustest selgelt eristavad, kuna neil oli ITS1 piirkonnas 33 nukleotiidi pikkused *indel*-tüüpi mutatsioonid, mida ühelgi teisel *Trebouxia* liigil ei olnud (lisa 3). Samuti eristusid fülogeneesipuul *T. arboricola* DNA järjestused toetatud alamklaadi A2 (toetus 66%); *T. decolorans* alamklaadideks D3 (toetus 73 %) ning D5 (toetus 61%) (joonis 5).

Tabel 2. Proovide elupaigad, substraadid, koordinaadid, fotobiondid, geenipanga lähimad vasted ning genotüübid fülogeneesipuul (* – proovid, kus kasutati analüüsis ainult 5´ ahelat, ** – proovid, kus kasutati analüüsis ainult 3´ ahelat)

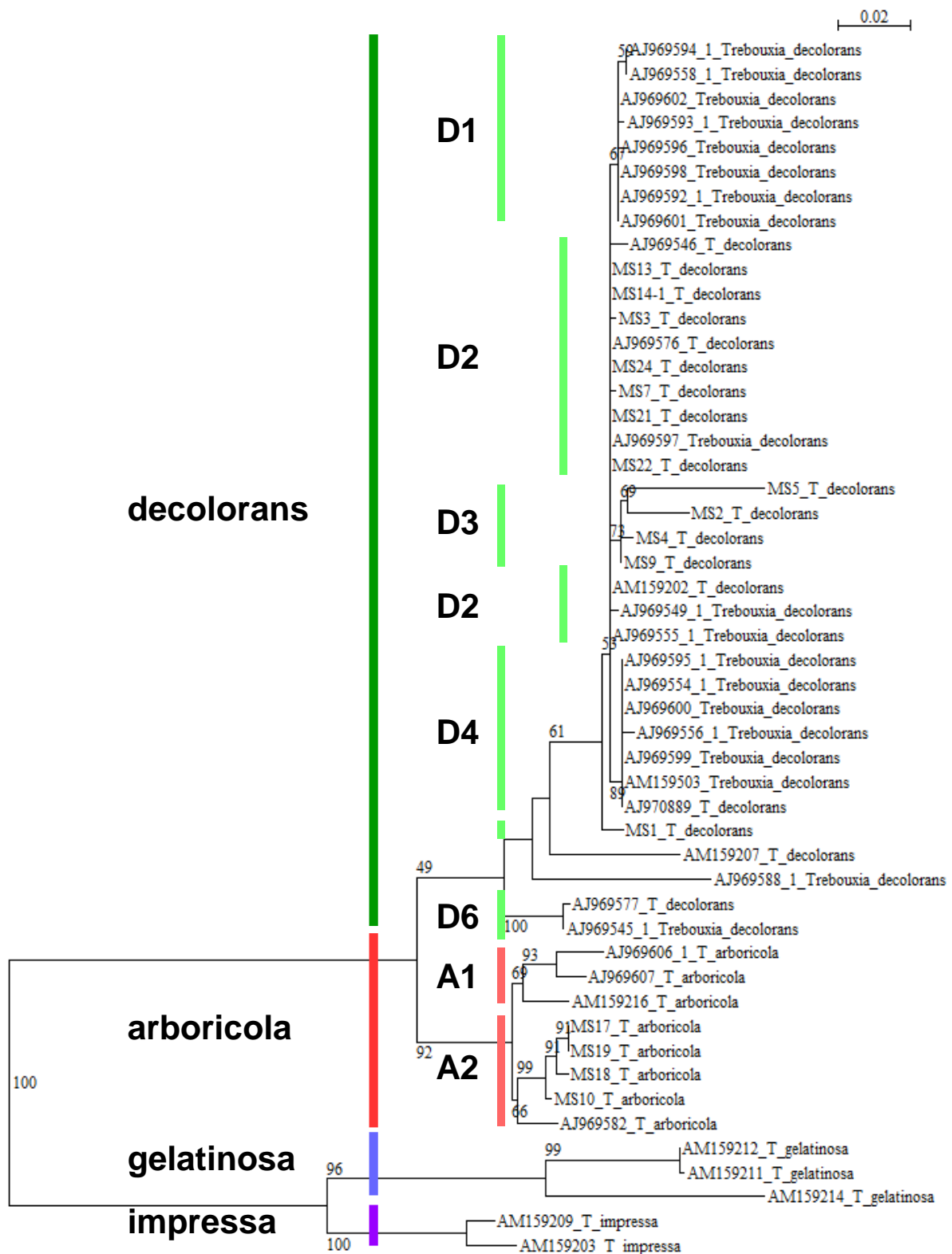
Proov	Elupaik	Substraat	Koordinaadid	Fotobiont	Geenipanga lähim vaste	Genotüüp fülogeneesipuul
MS1	Tähtvere park	Harilik vaher	N 58°23'1" E 26°42'32"	<i>T. decolorans</i>	AJ970889	D5
MS2	Annelinn	Harilik saar	N 58°22'25" E 26°46'45"	<i>T. decolorans</i> *	AJ969576	D3
MS3	Emajõgi	Harilik vaher	N 58°22'49" E 26°43'38"	<i>T. decolorans</i>	AM159202	D2
MS4	Pärnu laht	Harilik vaher	N 58°22'33" E 24°29'29"	<i>T. decolorans</i>	AM159202	D3
MS5	Pärnu laht	Harilik mänd	N 58°22'38" E 24°29'27"	<i>T. decolorans</i> *	AJ969576	D3
MS6	Emajõgi	Harilik vaher	N 58°22'50" E 26°43'37"	<i>T. decolorans</i> *	AM159202	Ei kasutatud
MS7	Emajõgi	Harilik vaher	N 58°22'48" E 26°43'40"	<i>T. decolorans</i>	AM159202	D2
MS8	Pärnu laht	Harilik mänd	N 58°22'38" E 24°29'57"	<i>T. decolorans</i> *	AJ969576	Ei kasutatud
MS9	Annelinn	Harilik saar	N 58°22'25" E 26°46'44"	<i>T. decolorans</i>	AM159202	D3
MS10	Annelinn	Betoon	N 58°22'23" E 26°46'45"	<i>T. arboricola</i>	AJ969582	A2
MS11	Pärnu laht	Betoon	N 58°22'56" E 24°29'3"	Topeltbändid	-	Ei kasutatud
MS12	Annelinn	Betoon	N 58°22'27" E 26°46'43"	<i>T. arboricola</i> *	AJ969582	Ei kasutatud
MS13	Annelinn	Harilik saar	N 58°22'25" E 26°46'44"	<i>T. decolorans</i>	AM159202	D2
MS14	Emajõgi	Graniit	N 58°22'50" E 26°43'39"	<i>T. decolorans</i>	AM159202	D2
MS15	Emajõgi	Graniit	N 58°22'50" E 26°43'38.5"	<i>T. decolorans</i> **	AM159202	Ei kasutatud
MS16	Emajõgi	Graniit	N 58°22'49" E 26°43'37"	<i>T. decolorans</i> **	AJ969546	Ei kasutatud
MS17	Annelinn	Betoon	N 58°22'23" E 26°46'46"	<i>T. arboricola</i>	AJ969582	A2
MS18	Pärnu laht	Betoon	N 58°22'55" E 24°29'1"	<i>T. arboricola</i>	AJ969582	A2
MS19	Pärnu laht	Betoon	N 58°22'53" E 24°29'6"	<i>T. arboricola</i>	AJ969582	A2
MS20	Tähtvere park	Betoon	N 58°23'4" E 26°42'19"	<i>T. decolorans</i> *	AJ969576	Ei kasutatud
MS21	Tähtvere park	Harilik tamm	N 58°23'3" E 26°42'27"	<i>T. decolorans</i>	AM159202	D2
MS22	Tähtvere park	Betoon	N 58°23'3" E 26°42'22"	<i>T. decolorans</i>	AM159202	D2
MS23	Tähtvere park	Betoon	N 58°23'3" E 26°42'25"	<i>T. decolorans</i> *	AJ969576	Ei kasutatud
MS24	Tähtvere park	Harilik vaher	N 58°23'2" E 26°42'31"	<i>T. decolorans</i>	AM159202	D2



Joonis 3. Hariliku korpsambliku fotobiondi liigid erinevatel substraatidel



Joonis 4. Hariliku korpsambliku fotobiondi liigid erinevates elupaikades



Joonis 5. Suurima tõenäosuse meetodiga saadud *Trebouxia* fülogeneesipuu. MS1–MS24 on siinses töös saadud ITS järjestused, AJ ja AM eesliitega proovid on geenipangast alla laaditud ITS järjestused; A1–A2 on *Trebouxia arboricola* alamklaadid, D1–D6 on *T. decolorans*’i alamklaadid. Numbrid fülogeneesipuu harude kohal tähistavad kingapaela meetodiga saadud toetusi (kingapaela meetodi tulemusel enam kui 50%-lise toetusega).

4.2.1. Fotobiondi liikide ja epifüütse vetika morfoloogilised erinevused

Valgusmikroskoobiga vaadates ei olnud *Trebouxia decolorans* ja *T. arboricola* välistunnuste poolest eristatavad: mõlemad liigid olid üherakulised ja ümmargused (foto 3, 1–2), proovi MS1 kõrval puukoorel kasvavad epifüütseid rohevetikad olid samblike fotobiontidest eristatavad: need olid jagunenud kaheks või neljaks rakuks (foto 3, 3). Kirjanduse andmetel peaks *T. decolorans* ja *T. arboricola* olema raku ehituse ja paljunemistunnuste järgi eristatavad, mistõttu on liiki *T. decolorans* käsitletud isegi teises perekonnas, *Pseudotrebouxia* (Ahmadjian, Hidreth 1981). Samas võivad neid liike eristavad mikrotunnused olla ainult vaadeldavad juhul, kui vetikaid kasvatatakse laboritingimustes vetikakultuurides.

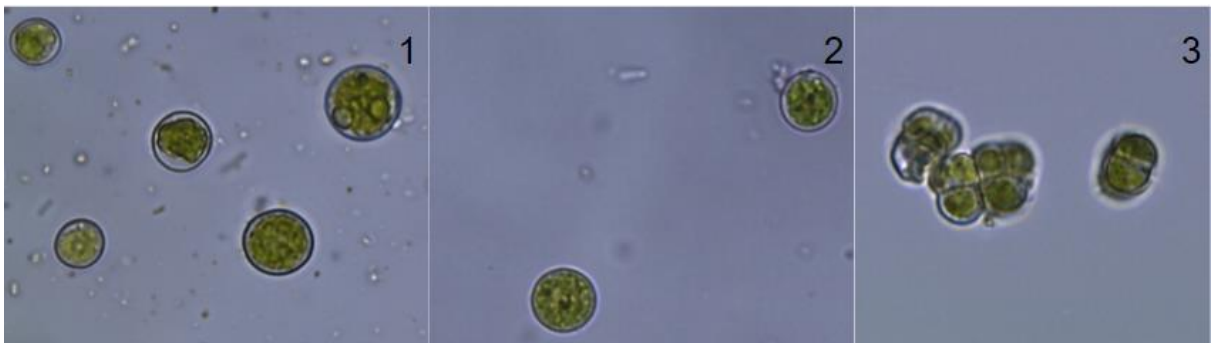


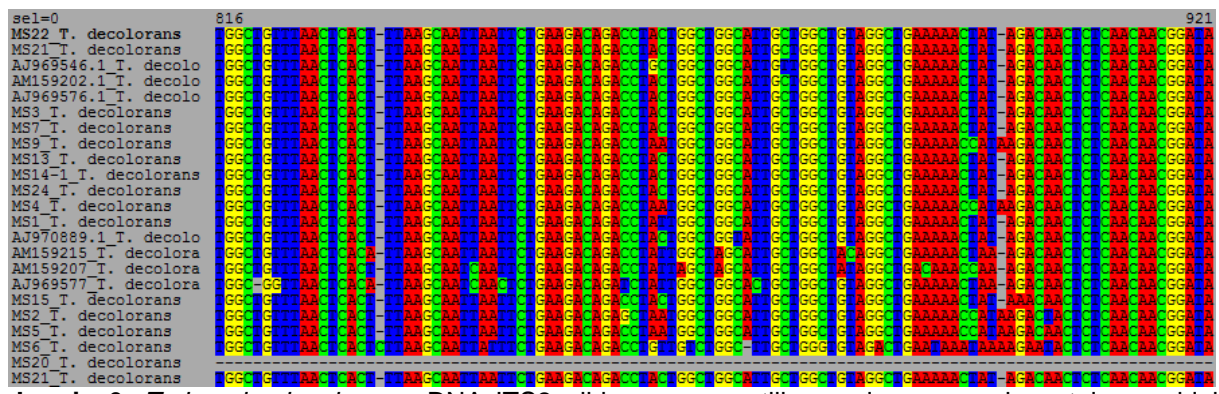
Foto 3. Erinevat liiki fotobiontide ja proovi MS1 lähedal kasvava rohevetika pildid 1 – *Trebouxia arboricola*, 2 – *T. decolorans*, 3 – epifüütne vetikas (autori fotod; pildidel olevate rohevetikate läbimõõt on 8–16 µm).

4.2.2. Fotobiondi liikide erinevad geneetilised variandid ja intronid proovis MS1

Kuigi hariliku korpsambliku tallustes esinesid fotobiontidena *T. decolorans* ja *T. arboricola*, ei olnud ei geenipangas talletatud DNA järjestused ega ka siinses töös saadud DNA järjestused omavahel täielikult identsed, vaid DNA järjestuste teatud piirkondades esines punktmutatsioone (joonis 6) ning proovid jagunesid fülogeneesipuul mitmesse erinevasse klaadi (joonis 5). Proovide geneetiline varieeruvus ei olnud geograafiliselt ega ka puu liigist sõltuv, kuid äärelinnast ja mere äärest korjatud proovid paigutusid fülogeneesipuul mitmesse omaette klaadi, D2 ja D3 ning A2 (joonis 5, tabel 2). Enamik *T. decolorans*’i proovidele lähim geneetiline variant oli geenipanga proov AM159202, mis oli korjatud Armeenias (tabel 2), ning need proovid koondusid fülogeneesipuul klaadi D2 (joonis 5). Proov MS1 jaotus fülogeneesipuul eraldi klaadi D5 (joonis 5). Geneetiliste variantide leviku uurimiseks peaks proove koguma laiemalt geograafiliselt territooriumilt, hõlmates teisi Euroopa riike.

Proovide geneetiline varieeruvus võib olla tingitud erinevatest põhjustest. Esiteks, äärelinnas ja mere ääres asuvad elupaigad on avatud, mistõttu on fotobiontidel võimalik lihtsamini keskkonda „sisse tulla“, kuna takistused levikuks puuduvad. Teiseks, need elupaigad on nooremad, mistõttu pole võib-olla neis veel domineerivat geneetilist varianti välja kujunenud. See eeldab, et ka üksteisele lähedal olevad, samal substraadil kasvavad liheniseeruvad seened saavad fotobiondi erinevatest allikatest. Selliseks levikuvektoriks võivad olla nt teod, kes söövad hariliku korpsambliku talluseid, mistõttu on neil võimalik fotobionte levitada oma väljaheidetega (Honegger jt 2013). Seetõttu tasuks edaspidi uurida ka üksteise kõrval kasvavaid sama fotobiondi liiki kasutavaid samblikke (nt harilikku korpsamblikku ja harilikku rippsamblikku), et vaadata, kas ühe substraadi piires esineb üks fotobiondi genotüüp.

Proov MS1 oli geelelektroforeesil vähem liikunud, kui teised proovid, mis viitas selle proovi DNA suuremale nukleotiidide arvule (lisa 2 foto 4). Programmiga SEAVIEW seda proovi teistega võrreldes oli sellel proovil kaks järjestikku paiknevat gruppi I kuuluvat intronit (186 ja 275 aluspaari), mis olid identsed ja asusid samas positsioonis (18S lõpus) geenipanga lähima vastega (AJ970889). Samas jaotusid fülogeneesipuul proovid MS1 ja AJ970889 erinevatesse klaadidesse, mistõttu saab oletada, et need intronid olid olemas juba siis, kui *Trebouxia* geneetilised variandid polnud veel välja kujunenud (joonis 5). Varasemates töodes on märgitud, et rohevetikast fotobiondi intronid levivad tõenäoliselt vertikaalselt, mis tähendab, et intronid pärandatakse eellaselt järglastele (Bhattacharya jt 2013, Honegger jt 2013), millega on võimalik selgitada nende intronite puudumist samast elupaigast korjatud teistes proovides. Seega saab veelkord oletada, et samades elupaikades kasvavad harilikku korpsambliku moodustavad seened saavad oma fotobiondi erinevatest allikatest.



Joonis 6. *Trebouxia decolorans* rDNA ITS2 piirkonna geneetiline varieeruvus erinevatel proovidel (vaadatud on kahe- ja üheaheeliste sekvenside ühte osa programmis SEAVIEW)

4.3. Fotobiondi seos elupaiga ja substraadiga

Varasemad uuringud on näidanud, et *T. decolorans* on valdav puudel kasvavatel ja *T. arboricola* kividel kasvavatel harilikel korpsamblikel (Honegger jt, 2013). Käesolev töö kinnitab seda väidet ainult osaliselt, kuna *T. decolorans* esines nii puult kui ka betoonilt ja graniidilt korjatud samblikes, kuid *T. arboricola* oli fotobiondiks ainult samblikes, mis olid kogutud betoonilt (joonis 3). Varasemalt on näidatud, et inimtekkelistel substraatidel (betoonil) kasvavatel samblikel võib esineda rohkem kui ühte liiki fotobionte (pt 2.3). Puudelt kogutud proovid andsid geelelektroforeesil selgemaid bände ja sekveneerimisel üldjuhul paremaid tulemusi, mis võiks tuleneda nende proovide väiksemast PCR-i inhibeerivate ainete hulgast (nt erinevad samblikuained või polüsahhariidid). Seetõttu tuleks kividelt ja puudelt korjatud proovide keemilist koostist kvantitatiivselt uurida, et leida sellele väitele kinnitust.

Siinse valimi juures pole võimalik välja tuua kindlaid seoseid elupaiga ja fotobiondi vahel, kuna *T. decolorans* esines kõigis elupaikades, aga *T. arboricola* esines ainult kahes elupaigas (joonis 4). Fotobiondi varieeruvust võis mõjutada sõiduteedele lähemal olevate elupaikade suurem raskemetallidega saastatus. Samas pole metallide saastatuse mõju fotobiondi liigi valikule veel tõestust leidnud (Backor jt, 2010). Edaspidi tuleks uurida fotobiondi varieeruvust samblikes, mis kasvavad ekstreemsemates (väga kõrge või madal temperatuur, liigniiskus, keskkonna saastatus) või stabiilsemates oludes.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli uurida, milline fotobiondi liik või genotüüp esineb hariliku korpsambliku (*Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.) tallustes erinevates elupaikades ja erinevatel substraatidel Eestis. Selleks korjati 24 sambliku tallust neljast erinevast elupaigast ja kolmelt substraadilt. Samblike tallustest eraldati DNA, amplifitseeriti ning sekveneeriti sellest fotobiondi rDNA ITS piirkond. Geenipanga järjestustega võrreldes saadi vasteteks kaks fotobiondi liiki, *Trebouxia decolorans* ja *T. arboricola*. *Trebouxia arboricola* eristus fülogeneesipuul omaette klaadina; *T. decolorans* jaotus klaadisiselt mitmesse erinevasse gruppi ning geenijärjestusi võrreldes esines neil mitmeid punktmutatsioone, mis viitasid erinevate geneetiliste variantide olemasolule.

Esimene hüpotees, et Eestis kasvav harilik korpsamblik assotsieerub mitme fotobiondi liigiga, leidis kinnitust, kuna harilikus korpsamblikus esines kaks fotobiondi liiki: *Trebouxia decolorans* ja *T. arboricola*. Teine hüpotees, et fotobiondi liik ja genotüüp sõltub substraadist, leidis osaliselt kinnitust, kuna *T. arboricola* esines ainult betoonil kasvavatel samblikel, kuid *T. decolorans* kõikidel substraatidel kasvavatel samblikel. Ka puudus seos genotüübi ja

substraadiga. Kolmas hüpotees, mis väitis, et fotobiondi liik ja genotüüp sõltuvad elupaigast, leidis samuti ainult osaliselt kinnitust, kuna *T. arboricola* esines kahes avatud elupaigas (mere ääres ja äärelinnas), aga *T. decolorans* kõikides elupaikades ning genotüüpidel ei olnud seost elupaikadega. Samas võis töö tulemusi mõjutada väike valim, mistõttu peaks edaspidi sarnaseid uuringuid teostama suurema hulga samblikega. Ka võiks edaspidi uurida, kas erinevad olud (nt temperatuuri- ja niiskuse gradient) mõjutavad fotobiondi varieeruvust samblikes. Samuti võiks uurida, kas samal substraadil kasvavad erinevad samblikud moodustavad talluse sama fotobiondi liigi või genotüübiga.

ABSTRACT

This research paper was written on the topic "The diversity of photobionts in association with *Xanthoria parietina* in Estonia based on the rDNA ITS sequences" by Mihkel Suija. The research had three hypothesis:

1. in Estonia *Xanthoria parietina* associates with more than one species of *Trebouxia*;
2. in different habitats *Xanthoria parietina* associates with a different *Trebouxia* species or genotype;
3. on different substrates *Xanthoria parietina* associates with a different *Trebouxia* species or genotype.

The sequences were obtained from 24 lichen thalli from four habitats (near a sea, near a fresh water source, from a suburban area and from a park) and three substrates (concrete, granite and tree). The study is based on the results of the DNA sequences obtained from the lichen thallus by amplifying lichen photobiont rDNA ITS area via polymerase chain reaction. The obtained sequences were compared with the ones downloaded from the GenBank. Sequences show that *Xanthoria parietina* associates with two photobiont species in Estonia: *Trebouxia arboricola* Puymaly and *T. decolorans* Ahmadjian. No substrate specific pattern of photobiont distribution was detected, but *T. arboricola* was only found in thalli which were growing on concrete. On the other hand *X. parietina* having *T. decolorans* as its photobiont was found from thalli growing on all substrates. Also no geographic pattern was found, although *T. arboricola* was found only in suburban area and near sea. One of the sequences of *T. decolorans*, had two subsequent introns with the combined length of 461 basepairs at the end of 18S subregion.

This research paper has been divided into four chapters. The first and second chapter provide a general overview of lichens and *Xanthoria parietina*, the third chapter describes the DNA extraction, PCR and DNA sequence analysis and the fourth chapter provides the results and discussion.

KASUTATUD MATERJALID

Ahmadjian, V., Hidreth K. C. 1981. A study of *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* isolates from different lichens. – The lichenologist nr 13, lk 65–86.

Archibald, Patricia A 1977. Physiological characteristics of *Trebouxia* (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Pseudotrebouxia* (Chlorophyceae, Chlorosarcinales). – Phycologia nr 16, lk 295–300.

Backor, Martin, Backorova Miriam, Peksa Onrej, Škaloud Pavel 2010. Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. – Ecotoxicology and Environmental Safety nr 73, lk 603–612.

Barreno, Eva, Casano Leonardo M., del Campo Eva M., del Hoyo Alicia, García-Breijo Francisco J., Gasulla Francisco, Guéra Alfredo, Reig-Armiñana José 2011. Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition? – Environmental Microbiology nr 13, lk 806–818.

Bhattacharya, Debashish, Honegger Rosmarie, Nyati Shyam, Werth Silke 2013. Phylogenetic analysis of LSU and SSU rDNA group I introns of lichen photobionts associated with the genera *Xanthoria* and *Xanthomendoza* (Teloschistaceae, lichenized Ascomycetes). – The Journal of Phycology nr 49, lk 1154–1166.

Edgar, Robert C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. – Nucleic Acids Research nr 32, lk 1792–1797.

eElurikkus 2017 = <http://elurikkus.ut.ee/index.php?lang=est>. Vaadatud 16.03.2017.

Friedl, Thomas, Helms Gert, Mayrhofer Helmut, Rambold Gerhard 2001. Identification of photobionts from the family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. – Lichenologist nr 33, lk 73–86.

Friedl, Thomas, Rokitta C. 1997. Species relationships in the lichen alga *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): molecular phylogenetic analyses of nuclear-encoded large subunit rRNA gene sequences. – Symbiosis nr 23, lk 125–148.

Gouy M., Guindon S., Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. – Molecular Biology and Evolution nr 27, lk 221–224.

Guzow-Krzemińska Beata 2006. Photobiont flexibility in the lichen *Protoparmeliopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. – The lichenologist nr 38, lk 469–476.

Honegger, Rosmarie, Nyati Shyam, Werth Silke 2013. Genetic diversity of sterile cultured *Trebouxia* photobionts associated with the lichen-forming fungus *Xanthoria parietina* visualized with RAPD-PCR fingerprinting techniques. – The Lichenologist nr 45, lk 825–840.

Jüriado jt = Jüriado, Inga, Piret Lõhmus, Eva Nilson, Tiina Randlane, Andres Saag, Lauri Saag, Ave Suija 2004. Eesti pisisamblikud. Tartu Ülikooli Kirjastus. Tartu.

Genbank 2017 = <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Vaadatud 15.02.17.-28.02.17.

Guiry, M.D., Guiry, G.M. AlgaeBase: National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. Vaadatud 17.12.2016.

Nash, Thomas H. 2008. Lichen Biology. Arizona: Arizona State University.

Peksa, Ondrej, Škaloud Pavel 2008. Changes in chloroplast structure in lichenized algae. – Symbiosis nr 46, lk 153–160.

PlutoF 2017 = <https://plutof.ut.ee>. Vaadatud 04.06.2017.

Randlane, Tiina, Trass Hans 1994. Eesti suursamblikud. Tartu: Greif.

Sequencher® version 5.4.6. DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA

Tavaré, Simon 1986. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. – Lectures on Mathematics in the Life Sciences nr 17, lk 57–86.

LISAD

Lisa 1. Laboris töötamise kuupäevad

26.01.17: DNA eraldamine

27.01.17: esimeste lahjendamata proovide ettevalmistamine polümeraasi ahelreaktsiooniks (PCR)

03.02.17: PCR produktide visualiseerimine geelelektroforeesil ja 10× lahjendatud proovide ettevalmistamine uueks PCR-ks

06.02.17: PCR produktide visualiseerimine geelelektroforeesil

07.02.17: Ebaõnnestunud proovide ettevalmistamine uueks PCR

09.02.17: Geelelektroforees 3

14.02.17: Õnnestunud PCR produktide puhastamine

20.02.17: PCR produktide ettevalmistamine sekveneerimiseks

22.02.17-23.02.17: PCR produktide sekveneerimisele saatmine

21.03.17: DNA eraldamine 2

22.03.17: PCR

23.03.17: Geelelektroforees ja PCR produktide puhastamine

24.03.17: PCR produktide ettevalmistamine sekveneerimiseks

Lisa 2. Viie polümeraasi ahelreaktsiooni geelelektroforeesi fotod

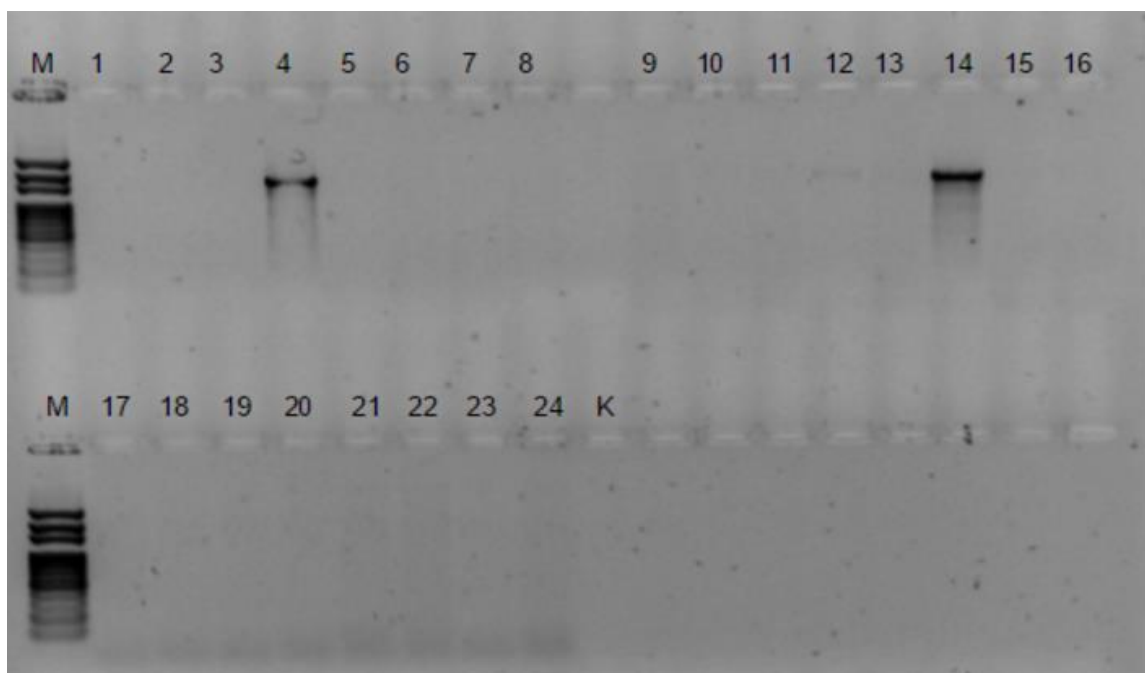


Foto 1. Esimese PCR-i geelelektroforees (numbrid 1–24 on DNA proovid, M on marker, mis on vajalik DNA pikkuse hindamiseks, ja K on kontrollproov)

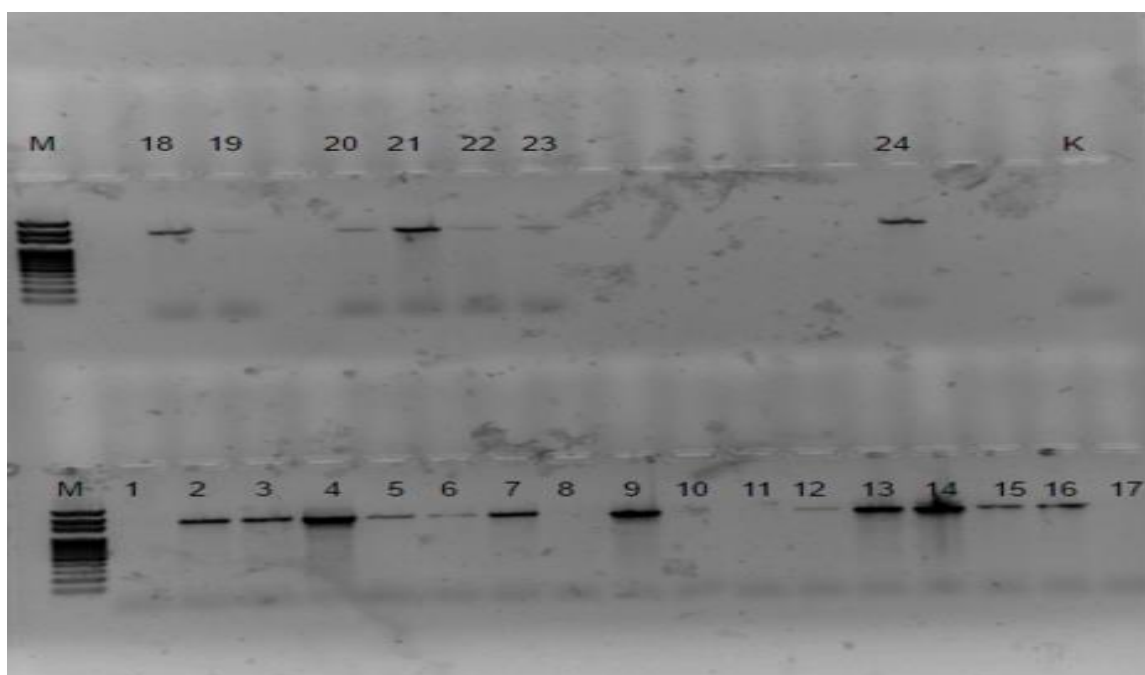


Foto 2. Teise PCR-i produktide geelelektroforees

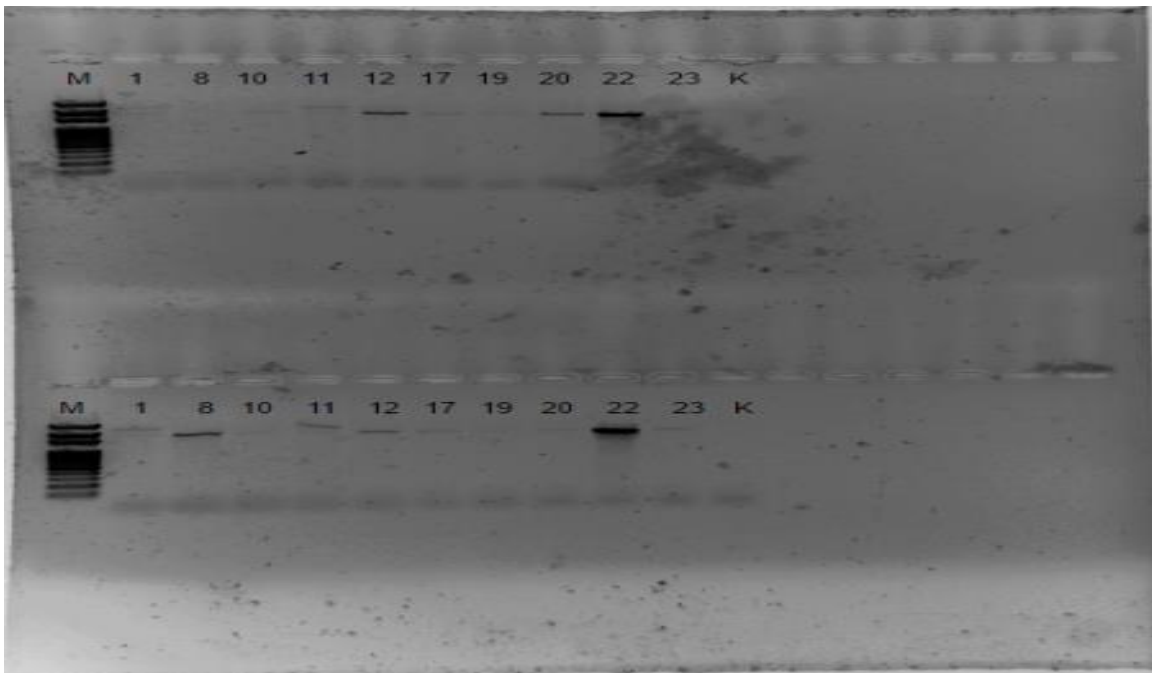


Foto 3. Kolmanda ja neljanda PCR-i produktide geelelektroforees

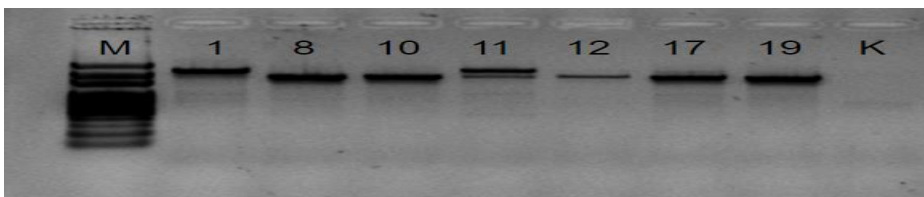


Foto 4. Viienda PCR-i produktide geelelektroforees

Lisa 3. *Trebouxia arboricola* erinevus teistest *Trebouxia* liikidest



Joonis 1. *T. arboricola* fotobiondile omane *indel* (vaadatud on nii kahe- kui üheaahelaliste proovide rDNA ITS 2 piirkonda programmis SEAVIEW)

Lisa 4. Fülogeneesipuu jaoks kasutatad geenipanga variandidid

Tabel 1. Fülogeneesianalüüsi jaoks kasutatud geenipanga geenijärjestuste järjenumbrid ja nende liik

Järjenumbr	Liik	Järjenumbr	Liik
AJ969582	<i>T. arboricola</i>	AJ969601	<i>T. decolorans</i>
AM159216	<i>T. arboricola</i>	AJ969576	<i>T. decolorans</i>
AJ969607	<i>T. arboricola</i>	AJ969546	<i>T. decolorans</i>
AJ969606	<i>T. arboricola</i>	AM159202	<i>T. decolorans</i>
AJ969555	<i>T. decolorans</i>	AJ969549	<i>T. decolorans</i>
AJ969556	<i>T. decolorans</i>	AJ969597	<i>T. decolorans</i>
AJ969600	<i>T. decolorans</i>	AM159503	<i>T. decolorans</i>
AJ969599	<i>T. decolorans</i>	AJ970889	<i>T. decolorans</i>
AJ969554	<i>T. decolorans</i>	AM159207	<i>T. decolorans</i>
AJ969595	<i>T. decolorans</i>	AJ969588	<i>T. decolorans</i>
AJ969592	<i>T. decolorans</i>	AJ969545	<i>T. decolorans</i>
AJ969593	<i>T. decolorans</i>	AJ969577	<i>T. decolorans</i>
AJ969598	<i>T. decolorans</i>	AM159211	<i>T. gelatinosa</i>
AJ969558	<i>T. decolorans</i>	AM159212	<i>T. gelatinosa</i>
AJ969594	<i>T. decolorans</i>	AM159214	<i>T. gelatinosa</i>
AJ969602	<i>T. decolorans</i>	AM159203	<i>T. impressa</i>
AJ969596	<i>T. decolorans</i>	AM159209	<i>T. impressa</i>

Lisa 5. Noore uurija stipendium

Tabel 2. Uurimistöö läbiviimiseks tehtud kulutused

Sekveneerimine	168 €
Erinevad kemikaalid	130 €
PCR	17 €
DNA eraldamine	17 €