

Tartu Ülikool  
Loodus- ja täppisteaduste valdkond  
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut  
Mükoloogia õppetool

Tiina Mandel

**VARIS-HABESAMBLIKU (*USNEA SUBFLORIDANA*) POPULATSIOONIDE  
GENEETILINE MITMEKESISUS EESTIS**

Magistritöö

Juhendajad: dotsent Tiina Randlane  
Polina Degtjarenko, MSc

Tartu 2016

## Infoleht

### **Vars-habesambliku (*Usnea subfloridana*) populatsioonide geneetiline mitmekesisus Eestis**

Töös hinnati laia levikuga liheniseerunud seene *Usnea subfloridana* geneetilist mitmekesisust 314 eksemplari põhjal kasutades üheksat mikrosatelliitset markerit. Töö eesmärgiks oli selgitada välja, kui eristunud on populatsioonid ja regioonid ning kas esineb seoseid metsa struktuuri ja geneetilise mitmekesisuse vahel. Laboratoorsete tööde käigus tehti olulisi muudatusi praimerite nukleotiidses järjestustes. Leiti, et liigi geneetiline mitmekesisus on kõrge ning suurima osa varieeruvusest seletab varieeruvus indiviidede vahel. Ei leitud seost geneetilise mitmekesisuse ja metsa vanuse vanuse või struktuuri vahel. Suur kloonide osakaal populatsioonide vahel viitab, et distantidel 1 – 10 km ei ole *U. subfloridana* levimine piiratud.

**Märksõnad:** Samblik, geneetiline mitmekesisus, mikrosatelliitsed markerid, *Eesti, Usnea subfloridana*

**CERCS (Common European Research Classification Scheme) teaduserialad:** B225

Taimogeneetika; B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia;

### **Genetic diversity of *Usnea subfloridana* populations in Estonia**

This study evaluates genetic diversity of widespread lichenized fungus *Usnea subfloridana* based on 314 exemplars using nine microsatellite markers. The aim of thesis was to find out how different are populations and regions, and if genetic diversity of studied epiphyte has any correlations with forest characteristics. The important changes in primers nucleotide sequences were made in this work. It was found that genetic diversity of lichenized fungus is high and the highest part of variation is explained by variance between the individuals. There was found no correlation between genetic diversity and forest age or structure. High percentage of multilocus genotypes indicates that in distances 1 – 10 km, the species is not restricted by dispersal.

**Key words:** Lichen-forming fungus, genetic diversity, microsatellite markers, Estonia *Usnea subfloridana*

**CERCS (Common European Research Classification Scheme):** B225 Plant genetics; B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

<b>Infoleht</b>	1
<b>Sisukord</b>	2
<b>1. Sissejuhatus</b>	4
<b>1.1.</b> Samblike paljunemine ja populatsioonigeneetika	5
<b>1.2.</b> Varajased uuringud	6
<b>1.3.</b> Molekulaarsed markerid	6
1.3.1.    Mikrosatelliitsed markerid	7
<b>1.4.</b> Samblikupopulatsioonide geneetilist mitmekesisust mõjutavad tegurid hariliku kopsusambliku näitel	9
1.4.1.    Majandamise mõju	9
1.4.2.    Häiringute mõju	10
1.4.3.    Fragmenteerituse ja elupaiga kvaliteedi mõju	10
<b>1.5.</b> Töö eesmärgid	11
<b>2. Materjalid ja meetodika</b>	12
<b>2.1.</b> Välitööd ja proovialad	12
<b>2.2.</b> Uurimisobjekt ( <i>Usnea subfloridana</i> )	14
<b>2.3.</b> Liikide määramine ja õhukese kihi kromatograafia	16
<b>2.4.</b> Molekulaarsed analüüsid	17
<b>2.5.</b> Nukleiinhapete ilmutamine geelelektroforeesi abil	17
<b>2.6.</b> Praimerite optimeerimine ja multipleksne PCR	17
<b>2.7.</b> Fragmentanalüüs	20
<b>2.8.</b> Andmeanalüüsi meetodid	20
<b>3. Tulemused</b>	21
<b>3.1.</b> Liikide määramine	21
<b>3.2.</b> <i>Usnea subfloridana</i> kemotüüpid	21
<b>3.3.</b> Lookuste varieeruvus	22
<b>3.4.</b> Populatsioonide varieeruvus	23
<b>3.5.</b> Hierarhiline AMOVA analüüs	24
<b>3.6.</b> UPMGA dendrogramm	25

3.7.	Populatsioonide geneetiliste distantside paarikaupa võrdlus	26
3.8.	Populatsioonide peakomponentanalüüs	27
3.9.	Regressiooni mudeli analüüs	28
3.10.	Erinevused regioonide vahel	28
4.	<b>Arutelu</b>	30
4.1.	Töö olulisus	30
4.2.	Metoodilised uuendused	30
4.3.	Markerite varieeruvus	30
4.4.	Geneetiline mitmekesisus <i>Usnea subfloridana</i> populatsioonide sees	31
4.5.	Geneetiline mitmekesisus populatsioonide vahel ja geenisiire	32
4.6.	Erinevused regioonide vahel ja seosed metsanduslike parameetritega	33
	<b>Kokkuvõte</b>	34
	<b>Summary</b>	35
	<b>Tänuavaldused</b>	35
	<b>Kasutatud kirjandus</b>	36
	<b>Lihtlitsents</b>	45
	<b>Lisa 1</b>	46
	<b>Lisa 2</b>	47
	<b>Lisa 3</b>	49

## 1. Sissejuhatus

Bioloogilise mitmekesisuse kontseptsioon hõlmab mitmekesisust kolmel eri tasandil: geneetilisel, liigilisel ja koosluste tasemel (Norse *et al.* 1986; Magurran 2004). Neist esimene, geneetiline, on suuna hilise arengu tõttu kõige vähem uuritud. Geneetilise mitmekesisuse all mõeldakse pärilikke molekulaarseid erinevusi isendite vahel, populatsioonide sees või nende vahel. Kuigi vaid väike osa geneetilisest mitmekesisusest väljendub fenotüübis, on see aluseks kõrgematele mitmekesisuse tasanditele. Lisaks sellele tõstab geneetiline mitmekesisus pikas perspektiivis populatsiooni või liigi võimet kohastuda ja hakkama saada uutes keskkonnatingimustes, tõstab koloniseerimisedukust ning on evolutsiooni aluseks (Pauls *et al.* 2013).

Samblik on liitorganism, milles esineb sümbiootiline suhe biontide vahel ning selle tulemusena tekib püsiv ja kindla ehitusega tallus (Kirk *et al.* 2008; Scheidegger ja Werth 2009). Fotobiondiks on rohevetikas või tsüanobakter. Samblikud on levinud polaaraladest troopikani, kasvades sageli ekstreemsetes tingimustes. Enamuse samblike areaal on palju suurem kui soontaimedel, samuti esineb sageli kontinentidevahelisi disjunktsioone, sellised levilad on võrreldavad pigem soontaimede perekonna areaalidega (Printzen *et al.* 2003). Geneetiline varieeruvus on eelduseks liikide kohastumisel ja uute elupaikade hõivamisel (Walser *et al.* 2003). Lihheniseerunud seente ja sümbiootiliste rohevetikate populatsioonide uurimiseks on kasutatud mitmeid meetodeid, kuid mikrosatelliitseid markereid peetakse parimateks, kuna need on kõrge varieeruvusega, informatiivsed ja polümorfsed (Mansournia *et al.* 2012; Werth 2010).

Vars-habesamblikku moodustav seen *Usnea subfloridana* Stirt. on üks väheseid boreaalaladel esinevaid lihheniseerunud seeni, millele mikrosatelliitsed markerid on praeguseks välja töötatud (Tõrra *et al.* 2014). Tegemist on huvitava uurimisobjektiga, kuna ühest küljest on samblik laialt levinud ja sage, kuid paljuneb peamiselt vegetatiivselt. Seega vaadeldav rikkalikkus võib olla paari eduka genotüübi levimise tulem. Selle samblikku moodustava seene geneetilise varieerumise ja ruumilise jaotuse uurimine on vajalik mõistmaks habesamblike ja üldisemalt parasvöötme lihheniseerunud seente levikut, geneetilist rikkust ning looduskaitsealaseid nõudmisi.

### 1.1. Samblike paljunemine ja populatsioonigeneetika

Samblikud paljunevad kas vegetatiivselt või suguliselt. Vegetatiivse paljunemise korral levivad foto- ja mükobiont koos; see paljunemisviis on samblike seas sage. Vegetatiivne paljunemine võib toimuda kas tallusest murdunud tükkide või spetsiaalsete, vegetatiivse paljunemise leviste e diaspooride abil, milleks on isiidid ja soreedid. Sugulise paljunemise korral levivad sümbiondid eraldi. Sel viisil moodustunud tallus on geneetiliselt erinev vanemtallusest, kuna lihheniseerunud seen paljuneb suguliselt (lisaks võib muutuda talluses sisalduv fotobiont) (Randlane *et al.* 2004).

Populatsioonigeneetika võib aidata mõista samblike leviku- ja paarumissüsteeme ning seeläbi aidata tõhustada ohustatud liikide kaitsemeetmeid. Samuti on sellest abi populatsiooni ajaloo ning evolutsioneerumise mõistmisel. Geneetiline struktuuri uurimine annab vastused näiteks küsimustele, kas ja kui kaua on populatsioon olnud isoleeritud või kui kaugel asuvaid populatsioone saab üksteisest isoleerituteks pidada (Werth 2010).

Üks sümbiootiliste organismide geneetilist struktuuri määravatest olulistest teguritest on sümbiontide kooslevi efektiivsus. Fotobiont võib järgmisse sambliku põlvkonda jõuda nii horisontaalse kui vertikaalse ülekande kaudu. Kui samblik kasutab uute elupaikade hõivamiseks klonaalset taktikat, pärinevad uuele tallusele alguse pannud fotobiondi ja mükobiondi rakud samast "ema" tallusest. Mõlema sümbiondi sarnased geneetilised mustrid ongi ootuspärased vertikaalse ülekande korral, samas kui horisontaalne geeniülekanne sümbiontide geneetilisi mustreid eristab (Otalora *et al.* 2011). Horisontaalseks ülekandeks loetakse nii seda, kui noores arengujärgus samblik oma fotobiondi välja vahetab, kui ka üksnes mükobiondi levimist askospooridega uude elupaika, kus ellujäämiseks on vaja leida uus fotobiont. Kohalik fotobiont võib pärineda nii vabalt elavast vetika populatsioonist kui ka mõne teise talluse levistest (Wornik ja Grube 2010). Samas võib asümmeetriline geenivool sümbiontide vahel põhjustada geneetilise struktuuri diferentseerumist vertikaalse ülekande tingimustes (Sullivan ja Stanley 2004).

## 1.2. Varajased uuringud

Esimesed samblike populatsioonide varieeruvust kirjeldavad uuringud põhinesid samblikuainete analüüsidel. Leiti, et hoolimata morfoloogilisest sarnasusest võib ka liigi piires esineda erinevaid kemotüüpe (Culberson 1986). Esimesed tõendid geenivoolust ilmnesid, kui leiti, et lihheniseerunud seente esimesel ja teisel põlvkonnal esinevad erinevad kemotüübid, kusjuures järglaste oma sarnanes pigem läheduses paiknevate talluste kemotüübile (Culberson ja Culberson 1994). Samblikuainete abil tõestati, et mõnedes mükobiondi taksonites on geenivool sagedas, samas kui teised taksonid võivad olla suguliselt isoleeritud (Culberson *et al.* 1993). Kuna sekundaarsed metaboliidid on samblike elutegevuses olulised, näiteks kaitsevad talluses paiknevaid vetikaid liiga tugeva valguse eest (Gauslaa ja McEvoy 2005), või tõrjuvad eemale parasiite (Stocker-Wörgötter *et al.* 2004), siis pole põhjust arvata, et kemotüübiline variatsioon alluks neutraalsele valikule (Werth 2010). Teise miinusena võib välja tuua kemotüüpide seotuse kindlate elupaigatüüpidega ning sekundaarsete metaboliitide kontsentratsiooni võimaliku kõikumise talluses sõltuvalt valguse intensiivsusest (Armaleo *et al.* 2008) või aastaajast (Bjerke *et al.* 2005; Gauslaa ja McEvoy 2005). Kolmandaks on kemotüübi põhistel uuringutel populatsioonide geneetilise analüüsi läbiviimiseks liialt väike lahutusvõime (Culberson ja Culberson 1994) ja seega kasutatakse tänapäeval eelkõige molekulaarseid meetodeid.

## 1.3. Molekulaarsed markerid

Sambliku tallus võib sisalda mitut fotobionti, endofüütseid baktereid, endofüütseid või lihhenikoolseid seeni ja seetõttu on tallusest mükobiondi DNA eraldamine problemaatiline. Mitmeid taimede ja loomade uurimiseks rakendatavad molekulaarsed meetodid, nt RFLP, RAPD ja ISSR pole seega hõlpsalt rakendatavad samblike puhul (Werth 2010). Molekulaarsete sõrmejälgede meetodid, mis põhinevad DNA amplifitseerimisel PCR-tehnoloogia abil on sageli väga tundlikud ka väikeste võõr-DNA koguste suhtes (Werth *et al.* 2006; Werth 2010).

Siiski on võimalik DNA sõrmejälgede meetodeid edukalt kasutada juhul kui suudetakse mükobionti kultuuris kasvatada. Mükobiontide isolaate on edukalt kasutanud näiteks Honegger kaasautoritega (2004) perekonna *Xanthoria* paaritumissüsteemide uurimiseks ja Seymour kaasautoritega (2005) perekonnas *Cladonia* samal eesmärgil. Lihheniseerunud seente jaoks on

koostatud isegi RAPD protokoll (Murtagh *et al.* 1999). Arvukate puhaskultuuri-proovide kasvatamine võib osutada aeganõudvaks ja keerukaks, lisaks pole paljusid mükobiondi liike võimalik sel viisil kasvatada (Miao *et al.* 2001). Universaalsetes DNA sõrmejälgede meetodites kasutatavad markerid on dominantsed, mis eristavad küll alleeli olemasolu või puudumise, kuid pole sobilikud päritolu või vanemlussuhete määramiseks (Werth 2010). Samblike molekulaarseks uurimiseks kasutatakse biondi-spetsiifilisi markereid. See välistab võõr-DNA-ga seotud segadused, kuna amplifitseeritakse ainult ühe biondi DNA-d. Mükobiondi puhul kasutatakse enim ITS (*internal transcribed spacer*), SSU (*small subunit*), LSU (*large subunit*) ja IGS (*intergenic spacer*) regioone ribosomaalses DNAs (rDNA). Kuigi need markerid on laialt kasutusel fülogeneetilistes uuringutes, ei pruugi nad olla piisavalt tundlikud populatsiooni-uuringuteks (Werth 2010).

### **1.3.1. Mikrosatelliitsed markerid**

Mikrosatelliite kui markerit saab kasutada kogu sambliku tallusel, kuna praimerid disainitakse ühe sümbiondi spetsiifiliselt. Miinuseks on see, et markerid tuleb disainida liigispetsiifiliselt või lähedalt suguluses olevate liikide rühmale kordustega külgnevate alade järjestuse järgi, mis eeldab eelteadmisi uurimisobjekti genoomi kohta. Praimerite disainimine ja katsetamine on aga kulukas nii ajaliselt kui rahaliselt.

Biondispetsiifilise mikrosatelliitmarkeri väljatöötamiseks tuleb kõigepealt kasvatada bionti puhaskultuuris või eraldada tallusest ainult ühe biondi rakud. Biondi DNA eraldatakse, sekveneeritakse ning selle põhjal koostatakse genoomne raamatukogu (sageli Illumina tooteid kasutades), kust mikrosatelliitseid kordusjärjestusi otsitakse programmi MSATCOMMANDER abil. Praimerid sünteesitakse mikrosatelliitidega külgnevate alade järgi (Grande *et al.* 2013; Alors *et al.* 2014; Tõrra *et al.* 2014).

Mikrosatelliitmeetodid suudavad tavaliselt tuvastata kõrge populatsiooni-sisese varieeruvuse, seega sobivad need ka molekulaarselt keerukate küsimuste, nt spooride päritolu tuvastamiseks (Werth 2011). Mikrosatelliitide abil saab kindalaks teha, kas tegemist on homotallismi ehk iseviljastumiga või heterotallismiga ehk isendite vahelise viljastumisega



(Walser *et al.* 2003). Kord juba arendatud praimerite edaspidi kasutamine on siiski osutunud suhteliselt odavaks ja efektiivseks (Jarne ja Lagoda 1996; Frankham *et al.* 2002; Werth 2010). Senini on mikrosatelliitmarkerid välja töötatud 12 lihheniseerunud seene jaoks, neist hilisemad on *Bryoria capillaris* (Nadyeina *et al.* 2014a) ja *Lobaria scrobiculata* (Prieto *et al.* 2015), täielik nimekiri on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Lihheniseerunud seened, millele on disainitud mikrosatelliitsed markerid

<b>Lihheniseerunud seen</b>	<b>Mikrosatelliitsete markerite arv</b>	<b>Viide</b>
<i>Lobaria pulmonaria</i>	12	Walser <i>et al.</i> 2003
	14	Werth <i>et al.</i> 2013
<i>Peltigera dolichorhiza</i>	11	Magain <i>et al.</i> 2010
<i>Buellia frigida</i>	5	Jones <i>et al.</i> 2012
<i>Parmotrema tinctorum</i>	4	Mansournia <i>et al.</i> 2012
<i>Protoparmeliopsis muralis</i>	7	Guzow-Krzeminska ja Stocker-Wörgötter 2013
<i>Bryoria capillaris</i>	18	Nadyeina <i>et al.</i> 2014a
<i>Nephroma parile</i>	12	Belinchón <i>et al.</i> 2014
<i>Nephroma laevigatum</i>	14	Belinchón <i>et al.</i> 2014
<i>Parmelina carporrhizans</i>	11	Alors <i>et al.</i> 2014
<i>Usnea subfloridana</i>	9	Tõrra <i>et al.</i> 2014
<i>Lobaria pindarensis</i>	18	Devkota <i>et al.</i> 2014
<i>Lobarina scrobiculata</i>	7	Prieto <i>et al.</i> 2015

#### **1.4. Samblikupopulatsioonide geneetilist mitmekesisust mõjutavad tegurid hariliku kopsusambliku näitel**

Geneetilise mitmekesisuse ja keskkonna vaheliste seoste kirjeldamiseks on enim andmeid kogunenud harilik kopsusambliku (*Lobaria pulmonaria*) uuringutest. Järgnevas käsitletakse lähemalt keskkonnafaktorite mõju selle lihheniseerunud seene geneetilisele mitmekesisusele.

##### **1.4.1. Majandamise mõju**

Looduslikul ja majandamata metsal on näidatud olevat elurikkusele mitmeti positiivne mõju. Jüriado kaasautoritega (2012) leidis, et vanas metsas on hariliku kopsusambliku geneetiline mitmekesisus suurem kui majandatud metsades või puisniitudel. Suurim geneetiline mitmekesisus tuvastati majandamata metsades vanadelt tammedelt, mille pikk eluiga (antud uuringus 200 – 400 a.) tekitab ajalise järjepidevuse, mis on oluline hoidmaks geneetilist mitmekesisust. Vanadel tammededel kasvavad tallused toimisid kui lätte funktsiooniga osapopulatsioonid, kust osa genotüüpe levis vegetatiivselt lähedal asuvatele noorematele puudele. Tulemused viitavad, et majandatud metsades ja puisniitudel domineerib vegetatiivne ning vanades metsades generatiivne paljunemine. Ainult vanades metsades leiti, et geneetiline erisus isendite vahel kasvas oluliselt juba lühikestel distantidel (Jüriado *et al.* 2012). Ka Scheidegger kaasautoritega (2012) on jõudnud tulemuseni, et majandamata metsades on *Lobaria pulmonaria* geneetiline mitmekesisus kõrgem kui majandatud metsades.

Majandusmetsade ja epifüütsete samblike seoseid käsitlevas metaanalüüsis (Nascimbene *et al.* 2013) leitakse, et lihheniseerunud seente liigirikkust mõjutab lisaks metsa vanusele (vanemas metsas leidub rohkem mikroelupaiku) ka metsa liigiline mitmekesisus, mis loob erinevaid kasvutingimusi sõltuvalt eri liiki puude koorte omadusetest (pH, krobelisus) ning metsa ajalooline struktuur. Giorgio kaasautoritega (2015) leidis, et *Lobaria pulmonaria* esinemine on vana metsa elementidest enim seotud suurte laia võraga puude ja lamapuidu esindatusega. Lihheniseerunud seeni käsitlevad uuringud puuduvad paljude Ida-Euroopa riikide majandadavate metsade kohta, kuigi selles piirkonnas paikneb suur osa Euroopa heitlehisest metsast (Nascimbene *et al.* 2013).

### 1.4.2. Häiringute mõju

Kaks uuringut käsitlevad suuremahuliste häiringute (lageraie, metsapõleng) mõju harilikule kopsusamblikule (*Lobaria pulmonaria*); lisaks vaadeldakse mõlemas uuringus valikraie mõju. Vastupidiselt ootustele leiti intensiivselt majandatud aladelt kõrgem geneetiline mitmekesisus, kui valikraiega aladelt (Werth *et al.* 2006). Põhjuseks võib olla, et intensiivse majandamise käigus tekkisid suured avatud alad, kus said kasvada valgusnõudlikumad vahtrad (*Acer pseudoplatanus*) (Kalwij *et al.* 2005), mis on seelses piirkonnas *Lobaria pulmonaria* eelistatuim kandjapuu, lisaks eelistab ka samblik valgusküllasemaid kasvukohti, seega võisid mõlemad liigid valgustingimuste paranemisest kasu lõigata (Werth *et al.* 2006). Nii põlenud kui lageraiatud alad olid hiljem uuesti asustatud sarnase minimaalse migratsioonisündmuste arvuga, millele hiljem järgnes kiire klonaalne paljunemine. Põlenud aladel oli klonaalsel paljunemisel suurim ulatus, enamus vegetatiivseid leviseid oli levinud kuni 150 meetri kaugusele (Werth *et al.* 2006) umbes 70 aasta jooksul (põleng toimus 130 a. tagasi ja *Lobaria pulmonaria* on võimeline asustama puid, mille vanus on vähemalt 60 a. (Öckinger 2005)). Werth kaasautoritega (2006) järeldas, et inimtekkeliste või looduslike häiringu mõju liigile *Lobaria pulmonaria* ei pruugi olla pikaajaline ning sõltub häiringu tüübist. Kuna ala uuesti asustamisel on oluline roll uude elupaika jõudvate leviste hulgal, siis Kesk-Euroopas, kus lageraied on sageli viinud liigi kohaliku väljasuremiseni, ei pruugi intensiivsest majandamisest taastumine sama edukalt kulgeda (Werth *et al.* 2006).

Samade populatsioonide põhjal on näidatud, et suuremahulised häiringud mõjutavad oluliselt populatsiooni sugulise paljunemise määra ja seega ka populatsiooni struktuuri ning *Lobaria pulmonaria* paljunemisstrateegiat. Lisaks täheldati negatiivset mõju biontide horisontaalsele ülekandele ja paardumistüüpide jaotusele populatsioonis, mis omakorda kahandab veelgi sugulise paljunemise osatähtsust (Singh *et al.* 2015).

### 1.4.3. Fragmenteerituse ja elupaiga kvaliteedi mõju

Uurides elupaiga kvaliteedi, ümbritsevate alade ning populatsioonide sidususe mõju geneetilisele varieeruvusele ilmnes, et olulist mõju omab ainult elupaiga kvaliteet (puude keskmine vanus) (Otalora *et al.* 2011). Hoolimata väikesest sugulise paljunemise osakaalust ja

elupaikade killustumisest on populatsioonide geneetiline mitmekesisus regioonis võrreldav suuremate ja sidusamate aladega (Otalora *et al.* 2011). Kuna nii lihheniseerunud seene kui kandjapuude generatsiooniaeg on pikk, võib vaadeldud geneetiline struktuur peegeldada populatsiooni varasemat olukorda ja muutused ilmnevad hiljem. Ka Belinchón kaasautoritega (2009) on leidnud, et elupaiga kvaliteet (puude läbimõõt) on oluline *L. pulmonaria* populatsioone mõjutav tegur. Otalora (2011) kaasautoritega leidis, et ruumiline mudel seletab ainult väikese osa geneetilisest varieeruvusest ja ümbritsevad alad ei avaldanud populatsioonide struktuurile olulist mõju. Hoolimata suurusest, oli vanemates metsalaikudes suurem geneetiline mitmekesisus. Elupaiga kvaliteet, näiteks vanade puude kättesaadavus on populatsiooni suurust, levikumustreid ja varieeruvust mõjutavatest teguritest ilmselt oluliseim (Otalora *et al.* 2011).

Sarnaseid tulemusi on teada ka Põhja-Euroopast: hoolimata vanade metsalaikude fragmenteeritusest läheb liigil *L. pulmonaria* oma leviku põhjapiiril Kesk-Norras hästi (Hilmo 2012). Vanemad kuusikulaigud olid eraldatud lageraie alade, kuuseistanduste ja põllumajandusmaastikega, ometi tuvastati kõrge geneetiline mitmekesisus. Proovialade vahel ilmes tugev geenivool ja identse genotüübiga isendeid leiti üksteisest 25 kilomeetri kauguselt, mis on enam kui leidis Jüriado kaasautoritega (2011) – 301 meetrit. Eoste levimine nii kaugusele võis toimuda otse või kasutades hüppelaudadena alade vahele jäävaid sobilikke vanemaid puid. Ka selles uuringus leiti ootamatult suur sidusus killustatuks peetud populatsioonide vahel, mis viitab sellele, et pikemas ajaskaalas ei pruugi *L. pulmonaria* olla kauglevimise poolt piiratud.

### **1.5. Töö eesmärgid**

Käesoleva töö eesmärkideks on anda ülevaade Eesti aladel kasvava vars-habesamblikku moodustava seene (*Usnea subfloridana*) geneetilisest varieeruvusest, võrrelda seda regiooniti ning leida seoseid metsanduslike parameetrite ja lihheniseerunud seene geneetilise mitmekesisuse vahel. Lisaks optimeerida ning tõhustada vars-habesambliku mikrosatelliitmarkeritega töötamise laboratoorset metoodikat.

Töös püstitati kaks hüpoteesi:

- 1) Põhja-Eesti ja Lõuna-Eesti populatsioonid on geneetiliselt eristunud
- 2) Vars-habesamblikku moodustava seene geneetiline mitmekesisus on positiivselt seotud metsa vanusega

## **2. Materjalid ja meetodika**

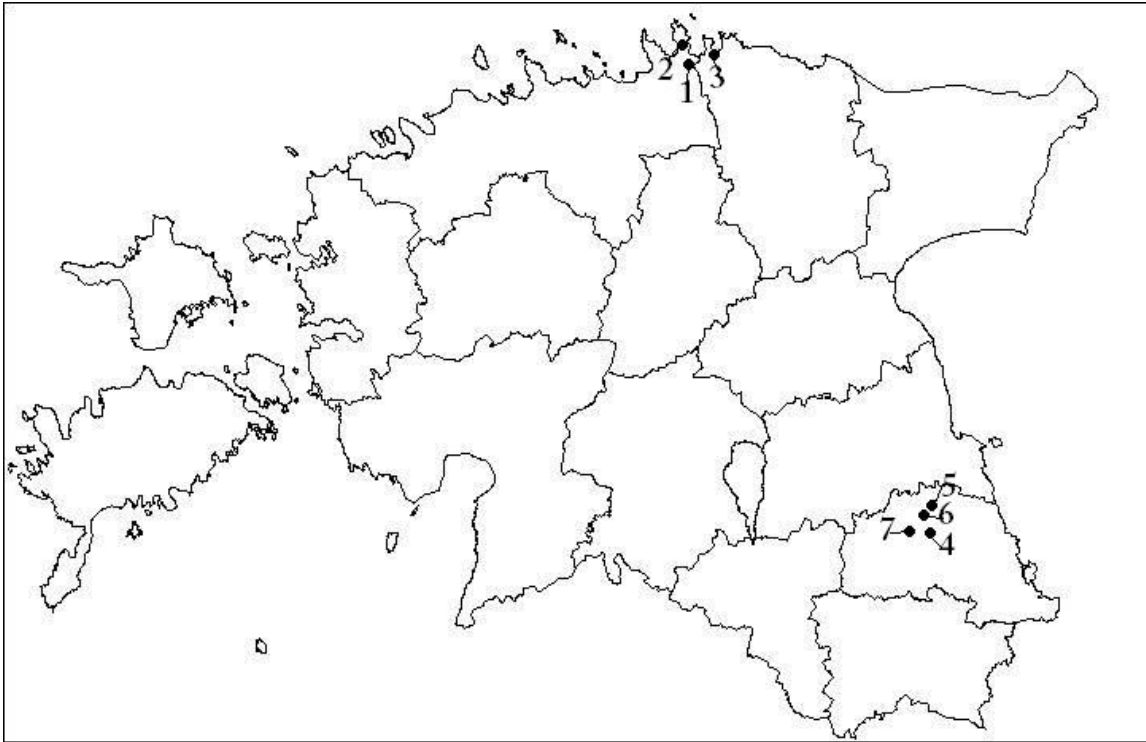
### **2.1. Välitööd ja proovialad**

Proovialad valiti Metsaregistri abil (Metsaregister); otsiti vars-habesamblikule sobivaid metsatüüpe, kus peapuuliigiks oleksid kas kuused või männid minimaalse vanusega 80 aastat. Põhja-Eestis toimusid välitööd ajavahemikul 07.09. – 08.10.2014 Tiina Mandeli, Polina Degtjarenko, Andres Saagi ning Tiina Randlase osavõtul. Iga uuringusse kaasatud puu juures võeti geograafilised koordinaadid, mõõdeti puu diameeter rinnasekõrguselt ning märgiti, mitu tallust korjati ning kas eksemplar koguti tüvelt või oksalt ja kas puu oli kuivanud. Eksempelare koguti oksakäärde abil kuni kuue meetri kõrguselt. Iga kogutud tallus säilitati eraldi paberkotikeses, et vältida talluse saastumist teiselt talluselt pärit isiididega. Kotid märgistati ning talluseid kuivatati toatemperatuuril avatud paberkottides 3 – 4 ööpäeva.

Proove koguti kokku kümnele alale, Põhja-Eestis kuuelt ja Lõuna-Eestis neljale proovialale. Käesolevas magistritöös kasutati geneetilisi andmeid seitsmelt proovialalt, millest kolm (1 – 3) paiknesid Põhja-Eestis Harju ning Lääne-Viru maakonnas ning neli prooviala (4 – 7) asusid Lõuna-Eestis, Põlva maakonnas (Joonis 1). Kolmelt proovialalt Lääne-Viru maakonnas (Vinni ning Laekvere valdades) kogutud materjali ei õnnestunud kasutada, kuna enamus neist eksemplaridest määrati mõneks teiseks liigiks. Põlva maakonnas paiknenud proovialadelt kogusid eksemplare suvel 2011 Tiiu Tõrra ja Liis Marmor, töö autor nende proovide kogumisel ega laboratoorsel töötlemisel ei osalenud. Proovialade metsanduslikud andmed on toodud tabelis 2.

Tabel 2. *Usnea subfloridana* uuritud populatsioonide kasvukohtade metsanduslikud parameetrid. D – puude keskmine diameeter (cm); V – puude vanus; KU – kuusk, MA – mänd, KS – kask, HB – haab, protsent – mitu % liik antud rindest moodustab

Pop nr	D	V	I rinne			II rinne		
			Liigid	Vanus	Protsent	Liigid	Vanus	Protsent
1	92,91	93	KU	95	60			
			KU	70	20			
			MA	95	20			
2	118,60	143	MA	144	80	KU	54	100
			KU	124	20			
3	90,36	129	MA	129	76			
			KU	129	24			
4	135,90	93	MA	97	50	KU	42	100
			KU	97	45			
			KS	97	4			
			HB	97	1			
5	82,80	86	MA	92	57	KU	72	100
			KU	92	34			
			KS	92	9			
6	121,00	85	MA	92	74			
			KU	92	16			
			KS	92	10			
7	76,81	84	MA	90	58	KU	72	100
			KU	90	38			
			KS	90	4			
<b>Keskmine</b>	103,47	105,14						



Joonis 1. Proovialad Põhja-Eestis Harju- ja Lääne-Viru maakonnas (1 – 3) ja Lõuna-Eestis Põlva maakonnas (4 – 7).

## 2.2. Uurimisobjekt (*Usnea subfloridana*)

Habesamblikud kuuluvad sugukonda *Parmeliaceae*, seltsi *Lecanorales* ja hõimkonda kottseened (*Ascomycota*). Perekonna *Usnea* kirjeldas Dillenius 1742. aastal. Habesamblike perekonda kuulub umbes 350 liiki (Kirk *et al.* 2008) ja nad on esindatud igal kontinendil, liikidel on sageli ulatuslik levila, kuid suurim liigirikkus koondub parasvöötme mõõdukalt niisketele aladele (Halonen *et al.* 1998). Iseloomulike tunnuste (põõsasjas, enamasti rippuv ning radiaal-sümmeetriline tallus, tugeva keskjuhtme olemasolu ning usniinhapest tingitud kergelt kollakas värvus) põhjal on perekonda kerge teistest eristada, aga perekonnas pole lihtne eristada liike, seda nii sarnase välimuse kui ka liigisisese morfoloogilise ja keemilise koostise varieeruvuse tõttu (Saag *et al.* 2011; Mark *et al.* 2016). Ühes liigis on kuni kuus kemitüüpi (Randlane *et al.* 2009). Perekonnas esineb taksonoomiline ebaselgus: nimesid on antud rohkem kui 770 liigile, aga pooled neist saaks lugeda sünonüümideks (Clerc 1998). Kiire jääajajärgne radiatsioon võiks

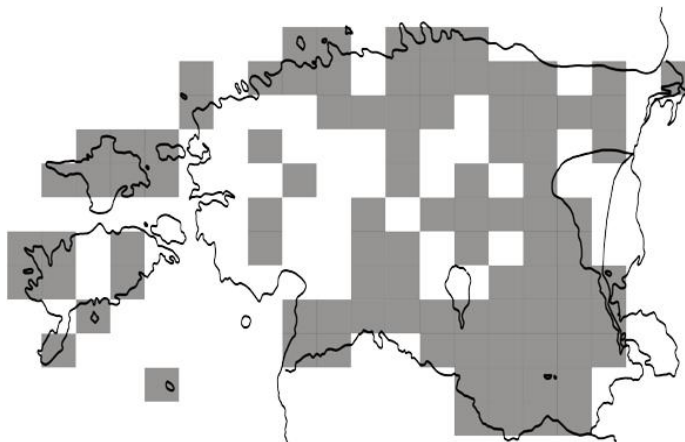
seletada segaseid fülogeneetilisi suhteid (Saag *et al.* 2011; Truong *et al.* 2013). Habesamblikud on kiiresti arenev rühm erakordselt kõrgete eristumismääradega (st mitu uut liiki või liini tekib miljoni aasta kohta) võrreldes teiste perekondadega sugukonnas *Parmeliaceae* (Kraichak *et al.* 2015). Eestis on usaldusväärset registreeritud 12 liiki habesamblikke moodustavaid seeni (Randlane ja Saag 1999; Randlane *et al.* 2015; Lisa 1).

Seniste teadmiste kohaselt on habesamblike fotobiondiks üherakuline vetikas perekonnast *Trebouxia* (Balarinová *et al.* 2013; Rafat 2014).

Vars-habesamblik on tavaline liik Euroopas ning teada peaaegu kõigist Euroopa riikidest (Randlane *et al.* 2009); Eestis on see üks laiemalt levinud habesamblikke (Joonis 2). Liik kasvab okaspuudel, kasel, puidul ja harva kivil (Randlane *et al.* 2009; 2011). Oluliseks määramistunnuseks on peaharu tumenemine kinnituskoha lähedal. Tallus on kahar, isotoomselt-dihhotoomselt harunenud, harud ei ole puhetunud ega väändunud ja peenenevad tipu suunas. Esineb arvukalt papille, fibrille ja punktikujulisi soraale (Randlane *et al.* 2011). Fibrille on ohtralt kinnituskoha lähedal, tippude pool hõredamalt. Sageli esinevad peaharul ristipidised ringikujulised praod. Koorikiht on pigem tüse, medulla õhuke ja tihe (Randlane *et al.* 2009).

Vars-habesamblikule (*Usnea subfloridana*) fülogeneetiliselt lähedane liik on *Usnea florida*. Morfoloogiline erinevus seisneb selles, et *U. subfloridana* paljuneb vegetatiivselt, liigil *U. florida* aga esinevad viljakehad. On välja pakutud, et need kaks taksonit moodustavad liigipaari, milles liiki *U. florida* käsitletakse sugulise, liiki *U. subfloridana* aga vegetatiivse vormina (Clerc 1984). Molekulaarsed analüüsid näitavad siiski, et mainitud liigid ei moodusta liigipaari, vaid pigem klaadi, kus nad esinevad läbisegi (Articus *et al.* 2002; Kelly *et al.* 2011; Saag *et al.* 2011). Mark kaasautoritega (2016) leidis kuue tuumamarkeri analüüsi põhjal, et *U. florida* ja *U. subfloridana* võiksid olla üks liik. Taksonoomilisi muudatusi ei pooldatud, kuna nimetatud liigid on ökoloogilistelt omadustelt erinevad – *U. florida* eelistab vanu laialehelisi metsi niisketes piirkondades ning on ohustatud või ohulähedane mitmetes Euroopa riikides, samas kui *U. subfloridana* on sagedasem ja ökoloogiliselt leplikum (Mark *et al.* 2016).





Joonis 2. Vars-habesambliku (*Usnea subfloridana*) levikukaart Eestis (Randlane *et al.* 2011).

### 2.3. Liikide määramine ja õhukese kihi kromatograafia

Töö autor puhastas ning vaatles valgusmikroskoobi abil 342 Põhja-Eestist kogutud habesambliku eksemplari. Vaadeldi, kas tallus on silmnähtavalt vanadustunnustega, kas seal kasvab peal nähtavaid lihhenikoolseid seeni, parasiite või esineb haigusnähte (nt ebanormaalsed värvi või plekiline tallus). Talluse tipmistelt harudelt eemaldati 0,05 g kaaluv osa edasisteks analüüsideks. Juhul, kui tallus kaalus täpselt või vähem kui 0,05 grammi, kaasati edasisteks analüüsideks kogu tallus. Talluse osad, mida analüüsidel ei kasutatud, säilitati märgistatult sügavkülmas (-20 °C).

Samblike sekundaarsete metaboliitide määramine viidi läbi õhukese kihi kromatograafia (*thin layer chromatography*, edaspidi TLC) abil. Talluse osad peenestati kääridega ning proovidele lisati 3 – 4 tilka atsetooni. Atsetoonis leotamine hõlbustab ka molekulaarsete analüüside läbiviimist, sest see protsess eraldab tallusest samblikuained, aga ka polüsahhariidid, mis võivad inhibeerida PCR analüüsi (Crespo *et al.* 1998). Proovidel lasti üks ööpäev kuivada, et aurustuksid viimasedki atsetoonijäägid. Seejärel määrati TLC abil 341 eksemplari kemotüüp, kasutades voolutit (White ja James 1985) ning kontrollidena skvamaat- ja tamnoolhappe lahuseid. Teada on kolm vars-habesambliku kemotüüpi: esimene sisaldab põhiainena tamnoolhapet, teine skvamaathapet, kolmas mõlemat (Halonen *et al.* 1998, 1999). Eestist on senini teada kaks esimest kemotüüpi (Tõrra ja Randlane 2007).

## 2.4. Molekulaarsed analüüsid

Molekulaarsed analüüsid viidi läbi Tartu Ülikooli bioloogilise mitmekesisuse tippkeskuse (FIBIR) seente ja taimede molekulaaranalüüside ühendlaboris (Ravila tn 14a) töö autori ja Polina Degtjarenko poolt.

DNA eraldati 5 mg peenestatud ja 3 – 4 ml atsetoonis leotatud samblikutallustest kasutades DNA eraldamise komplekti PowerPlant® Pro DNA Isolation Kit (MO BIO), mis on spetsiaalselt välja töötatud tugevatest taime- ja seenekudedest DNA eraldamiseks. DNA eraldamisel järgiti tootja juhendit väikeste modifikatsioonidega, mis hõlmasid peamiselt tsentrifuugimise aja pikkust ja sagedust ning purusti kasutamise aega (modifitseeritud protokoll Lisas 2).

## 2.5. Nukleiinhapete ilmutamine geelelektroforeesi abil

Nukleiinhapete visualiseerimise eesmärgiks oli kontrollida, kas proovid sisaldavad huvipakkuvaid DNA lõike. Nukleiinhapete ilmutamiseks valmistati agarosgeel vastavalt Bimboim ja Doly (1979) modifitseeritud protokollile (Lisa 3). Enne geelile kandmist segati 5 µl proovi 1 ml värvainega *DNA Loading Dye Buffer Blue* ning loksutati hoolikalt (*vortex* 2 sekundit). Igale reale geelis lisati ühte kaevu võrdluseks molekulaarse kaalu põhise *Ladder* (redel) markerit. Elektroforeesil lasti töötada ligikaudu 30 minutit. Geeli vaadeldi UV valguses 245 nm lainepikkusel, tulemus salvestati ekraanitõmmisena. Proovidest, mille puhul elektroforees bändiribasid ei näidanud või olid need väga õrnad, eraldati DNA uuesti ja korrati eelnevaid protseduure.

## 2.6. Praimerite optimeerimine ja multipleksne PCR

Käesolevas töös kasutati üheksat Tõrra *et al.* (2014) poolt välja töötatud *Usnea subfloridana* spetsiifilist polümorfset mikrosatelliitmarkerit (Tabel 3). Testimisel leiti, et praimerid ei amplifitseeri järjestusi ning tuvastati viga kõigis vastassuunalistes praimerites. Nukleotiidsete järjestuse kontrollimisel Geenipangast (Genbank) selgus, et artiklis toodud vastassuunalised praimerid on otse genoomsest järjestusest kopeeritud sekventsidsid. Selleks, et saada töötavaid

praimereid, tuli järjestusi muuta *Reverse Complement* programmi (Stothard 2000) abil komplementaarsusprintsipi arvestades. Muudetud praimerid on toodud tabelis 4.

Tabel 3. *Usnea subfloridana* jaoks disainitud mikrosatelliitpraimerid (Tõrra *et al.* 2014). F – pärisuunaline (*forward*), R – vastassuunaline (*reverse*)

Praimeri nimi	Praimeri nukeotiidne järjestus (5'-3')	Kordusmotiiv	Pikkus (aluspaarides)	Seondumistemperatuur (°C)	Järjestuse number Geenipangas
Us01	F: CCCTCCAATCCCATATATAC R: GATCCATCGTCTCCATGATA	(CA) <sub>10</sub>	182 - 303	59	KC912190
Us02	F: GTTTGCGAGGGATACTTTAC R: GTAGAAAGACAAGGACGCAC	(TA) <sub>10</sub>	83 - 89	57	KC912191
Us03	F: CCATCTCAAACCCGATAGTC R: CCTCTTATCCTTTGGCAAAT	(CTT) <sub>11</sub>	192 - 218	57	KC912192
Us04	F: ATTCTCCGCGAGTCAAGTAG R: CTTTACTTTGCGAGCTTCAG	(CAT) <sub>9</sub>	181 - 196	57	KC912193
Us05	F: TCTGGGATGGATGGCATT R: GCGGGAAAGCCACAGATA	(CA) <sub>9</sub>	161 - 175	57	KC912194
Us06	F: CGATGGCGTAATGATCAG R: CAAACATTTCGCGTCAGTTAC	(GAT) <sub>9</sub>	106 - 127	57	KC912195
Us07	F: TCCTGAGTTTGAGCCTCTTG R: GTCCAACGCAGCTACTCTCT	(GTC) <sub>8</sub>	123 - 135	57	KC912196
Us08	F: CCTTCACCTTCCCTATACACC R: GAATCCCAGTCAATGCACTC	(AAC) <sub>10</sub>	192 - 217	57	KC912197
Us09	F: GGAAGGTATGAGGTGAGGTG R: AGAATTTGCAGCACGGGTA	(GGAT) <sub>6</sub>	341 - 372	57	KC912198

Tabel 4. Töös kasutatud parandatud praimerite nukleotiidne järjestus suunal 5'-3', praimerite kontsentratsioon 100 µL lahuse kohta ning alleeli pikkuste varieeruvus aluspaarides

Praimeri nimi	Pärisuunaline ( <i>foreward</i> ) praimer	Vastassuunaline ( <i>reverse</i> ) praimer	Kontsentratsioon (µL)	Pikkus aluspaarides
Us01	CCCTCCAATCCCATATATAC	TATCATGGAGACGATGGATC	0,05	182 – 244
Us02	GTTTGCAGGGGATACTTTAC	GTGCGTCTTGTCTTTCTAC	0,06	167 – 179
Us03	CCATCTCAAACCGATAGTC	ATTTGCCAAAGGATAAGAGG	0,12	167 – 233
Us04	ATTCCTCCGCAGTCAAGTAG	CTGAAGCTCGCAAAGTAAAG	0,06	180 – 198
Us05	TCTGGGATGGATGGCATT	TATCTGTGGCTTTCCCGC	0,2	322 – 348
Us06	CGATGGCGTAATGATCA	GTAAGTACGCGAATGTTTG	0,12	112 – 130
Us07	TCCTGAGTTTGAGCCTCTTG	AGAGAGTAGCTGCGTTGGAC	0,02	123 – 138
Us08	CCTTACCTTCCCTATACACC	TACCCGTGCTGCAAATTCT	0,03	191 – 218
Us09	GGAAGGTATGAGGTGAGGTG	TCTTAAACGTCGTGCCCAT	0,3	340 – 368

PCR analüüsi läbiviimiseks kasutati Tõrra *et al.* (2014) järgi praimerite segusid, mida tähistatakse edaspidi vastavalt Mix 1, Mix 2 ja Mix 3. PCR reaktsioonisegude valmistamisel kasutati Type-it Microsatellite PCR (QIAGEN) komplekti vastavalt tootja juhendile. Segus Mix 1 amplifitseeriti lookus Us01, segus Mix 2 lookused Us02 – Us06 ning segus Mix 3 lookused Us07 – Us09. Segude kokku segamisel ja PCR programmi leidmisel lähtuti Tõrra *et al.* (2014) juhendist. Kuna segu Mix 1 ei andnud häid tulemusi (elektrofooresil ei ilmenud selgeid bändiribasid), katsetati erinevate PCR termotsükleri programmidega, muutes praimerite seondumise temperatuuri ning tsükliite arvu ning praimerite segu kontsentratsiooni.

Originaaljuhendis olid nimetatud parameetrid: praimerite seondumine 59 °C, 28 tsükliit, praimerite segu lisatud 0,2 µL.

Kahel katsel muudeti nimetatud parameetreid järgnevalt:

- 1) Praimerite seondumine 59 °C, 30 tsükliit, praimerite segu lisatud 0,5 µL
- 2) Praimerite seondumine 57 °C, 32 tsükliit, praimerite segu lisatud 0,35 µL

Võrreldes saadud tulemusi geelelektrofooresil, leiti, et esimene variant annab paremaid tulemusi ning seda kasutati edasistes analüüsid. Andmed kasutatud praimerisegude ja PCR-reaktsiooni kohta on toodud lisa 2.

## 2.7. Fragmentanalüüs

Proovid valmistati fragmentanalüüsiks ette GeneScan™ 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) juhendi järgi. Fragmentanalüüsi ühes proovis oli omavahel segatud 8,9 µl Hi-Di formamiidi, 0,1 µl suurusstandardit LIZ500 ning 1 µl märklaud-DNA-d (PCR-i produktide segu). PCR-produktide segu lahjendati eelnevalt destilleeritud veega 25 korda. Proovid hoiustati analüüsini sügavkülmikus (-20°C). Fragmentanalüüs telliti Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudist; see viidi läbi masinal kapillaarsekvenaator ABI 3730xl DNA Analyzer.

## 2.8. Andmeanalüüsi meetodid

Amplifitseeritud DNA lõikude pikkuste saamiseks analüüsiti fragmentanalüüsi tulemusi programmiga GeneMapper® Software v 4.0 (Applied Biosystems) vastavalt PCR-il kasutatud suurusstandardile LIZ500.

Kasutades programmi RStudio (Rstudio Team) arvutati iga populatsiooni unikaalsete genotüüpide arv (G), unikaalsete genotüüpide protsent (M), minimaalne koloneerimisündmuse arv ehk minimaalne alleelide arv lookuses (C) populatsiooni kohta ning unikaalsete genotüüpide arv kõigi uuritud eksemplaride kohta kasutades Werth *et al.* (2006) skripti. Programmiga Microsatellite analyzer (MSA) 4.05 (Dieringer ja Schlötterer 2003) leiti keskmine alleelide arv populatsiooni kohta ehk alleelide mitmekesisus (A), Shannoni indeks (S) (Shannon ja Weaver 1949) ja Nei tasakaalustamata geneetiline mitmekesisus (H) (Nei 1978). MSA kasutab hõrendamise meetodit (*rarefaction method*) alleelide mitmekesisuse puhul. Kuna alleelide mitmekesisus populatsioonis sõltub tugevalt eksemplaride arvust, soovitatakse kasutada nende arvutamiseks just seda meetodit (Maretto *et al.* 2013; Dudaniec *et al.* 2010; Widmer *et al.* 2012).

Uurimaks geneetilise varieeruvuse jaotumist regioonide, populatsioonide ja isendite vahel, viidi programmiga GenAlEx 6.5 (Peakall ja Smouse 2006) läbi hierarhiline AMOVA analüüs (*Analysis of Molecular Variance*). Lisaks tehti geneetiliste distantide (GD) põhjal peakoordinaatanalüüs (PCoA), leiti privaatsete alleelide arv (P) populatsioonis ja alleelipikkuste varieervus lookuses ning tuvastati identsed multilookus genotüübid. Populatsioonide geneetilisi distantse võrreldi ka paarikaupa. Programmipaketiga Phylip 3.696 (Felsenstein 2013) koostati

Nei geneetilise identiteedi maatriksi põhjal (Nei 1978) UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) meetodil 100 dendrogrammi põhjal konsensuspuu (populatsioonide dendrogramm). Sisendina kasutati Nei tasakaalustamata (*unbiased*) kauguste maatriksit (Nei 1978). Dendrogrammi visualiseerimiseks kasutati programmi FigTree (Rambaut *et al.* 2015).

Geneetilise mitmekesisuse (H) ja metsanduslike parameetrite (puude diameeter, metsa vanus ja liigiline koosseis) vaheliseid seoseid uuriti samm-sammulise tunnuste sissevõtuga regressiooni mudeli analüüsi (General Regression Analysis with the stepwise selection procedure) abil kasutades programmi STATISTICA 7 (StatSoft 2004). Sama programmiga viidi läbi T-test hindamaks regioonide vaheliste erinevuste statistilist olulisust.

### 3. Tulemused

#### 3.1. Liikide määramine

Analüüsidest TLC tulemusi, selgus, et 173 eksemplari vastavad ühele liigi *Usnea subfloridana* kemotüübile. Ülejäänud isendid vastasid liikide *Usnea hirta* või *Usnea wasmuthii* kemotüüpidele (Tabel 5) ning eemaldati seetõttu edasistest analüüsides. Väheses arvu liigi *Usnea subfloridana* isendite tõttu kõrvaldati kolme Lääne-Virumaal paikneva populatsiooni isendid edasistest analüüsides.

Tabel 5. Kogutud eksemplaride jagunemine liigiks *U. subfloridana* ja teisteks liikideks TLC põhjal Põhja-Eesti kuuel proovialal

Maakond	<i>U. subfloridana</i>	Muu	Kokku
Harjumaa	145	27	172
Lääne-Virumaa	28	142	170

#### 3.2. *Usnea subfloridana* kemotüübid

Uuritud 319 eksemplari puhul oli ülekaalus skvamaathapet sisaldav kemotüüp (SQU), mis esines 169 isendil (53%); tamnoolhappe kemotüüp (TAM) esines 143 eksemplaril (44,8%) (Tabel 6). Kolmel eksemplaril populatsioonis nr 6 ei esinenud kumbagi nimetatud samblikuainet, populatsioonis nr 7 oli üks eksemplar, mis sisaldas tundmatut ainet. Populatsioonist nr 3 leiti eksemplar, mis sisaldas nii tamnool- kui skvamaathapet, sellist vars-habesambliku kemotüüpi ei ole varem Eestist leitud (Tõrra ja Randlane 2007). Vaadeldes tulemusi regiooniti, selgub, et

Lõuna-Eesti populatsioonides on kemotüübid ühtlasemalt jaotunud (55 TAM ja 56 SQU) kui Põhja-Eestis (89 TAM ja 114 SQU). Suurim SQU kemotüübi ülekaal esines populatsioonis nr 4 (60%).

Tabel 6. *Usnea subfloridana* kemotüübid uuritud populatsioonides. TAM – tamnoolhappega kemotüüp, SQU – skvamaathappega kemotüüp, N – uuritud isendite arv populatsioonis

Pop nr	Isendite arv kemotüübiti			Kemotüüpide % jaotus			N
	TAM	SQU	Muu	TAM	SQU	Muu	
1	24	22		52,2	47,8		46
2	11	19		47,8	52,2		23
3	20	15	1 <sup>a</sup>	55,6	41,6	2,8 <sup>a</sup>	36
4	24	36		40	60		60
5	18	20		47,4	52,6		38
6	23	24	3 <sup>b</sup>	46	48	6 <sup>b</sup>	50
7	24	34	1 <sup>c</sup>	40,7	57,6	1,7 <sup>c</sup>	59
<b>Kokku</b>	143	169	4	44,8	53	1,2	319

<sup>a</sup> tamnool- ja skvamaathappega kemotüüp

<sup>b</sup> südamikukihiaineteta kemotüüp

<sup>c</sup> tundmatu ainega kemotüüp

### 3.3. Lookuste varieeruvus

Üheksa lookuse kohta tuvastati 77 erinevat alleeli (Tabel 7). Kõik üheksa uuritud lookust olid polümorfsed. Keskmine alleelide arv lookuse kohta varieerus vahemikus 3,14 (Us04) – 8,71 (Us03), keskmiselt 5,73 (Tabel 7). Kõige varieeruvam oli lookus Us01, kus esines kokku 15 alleeli, kümme alleeli esines veel lookustes Us03 ja Us05 (Tabel 7). Kõige vähem alleele (4) esines lookuses Us04. Ülejäänud lookustes esines 6 – 8 alleeli (Tabel 7). Ainult Põhja-Eestile iseloomulikud privaatsed alleelid esinesid lookustes Us02 (169 (aluspaaride arv)) ja Us08 (201). Lookuses Us03 leiti kaks alleeli, mis olid iseloomulikud Põhja-Eestile (221 ja 227) ning üks (233), mis esines ainult Lõuna-Eesti populatsioonides. Ainult Lõuna-Eestile iseloomulikke alleele leiti 4 lookusest: Us01 (214, 222, 244) Us05 (340, 346, 348), Us06 (130) ja Us09 (340, 356).

Tabel 7. Alleelide arv lookuse ja populatsiooni kohta ning markeri varieeruvus aluspaarides kõigi alleelide kohta

Lookus	Populatsioon							Min/Max	Keskmine	Kokku	Varieeruvus
	1	2	3	4	5	6	7				
Us01	6	6	6	11	8	9	11	6/11	8,14	15	182 – 244
Us02	5	4	6	6	6	5	5	4/6	5,29	7	167 – 179
Us03	8	9	10	9	8	9	8	8/10	8,71	13	191 – 233
Us04	3	3	4	3	3	3	3	3/4	3,14	4	180 – 198
Us05	6	6	5	7	7	6	7	5/7	6,29	10	322 – 348
Us06	6	5	5	6	6	6	5	5/6	5,57	7	112 – 130
Us07	4	4	4	4	4	4	4	4/4	4,00	6	123 – 138
Us08	7	5	6	6	6	6	6	5/7	6,00	7	191 – 218
Us09	4	4	4	4	5	4	6	4/6	4,43	8	340 – 368
<b>Kokku</b>	49	46	50	56	53	52	55			77	

### 3.4. Populatsioonide varieeruvus

Kõigi uuritud 319 isendi kohta leiti 213 unikaalset genotüüpi (68,7%). Unikaalsete genotüüpide protsent populatsiooni kohta varieerus 76% – 90% (Tabel 8). Geneetiline mitmekesisus (H) varieerus vahemikus 0,59 (pop 1) kuni 0,66 (pop 4). Alleelide mitmekesisus (A) populatsiooni kohta varieerus vahemikus 5,11 – 6,22 ning Shannoni indeks (I) vahemikus 1,25 – 1,96 (Tabel 8). Kõigis populatsioonides esines vähemalt üks privaatne alleel. Enim privaatseid allelele esines populatsioonides 4 ja 6. Need olid ka uuritud isendite arvult ühed suurimad. Minimaalne koloneerimissündmuste arv oli väikseim populatsioonides 1 ja 5 (8 sündmust) ja kõrgeim populatsioonides 4 ja 7 (11) (Tabel 8).



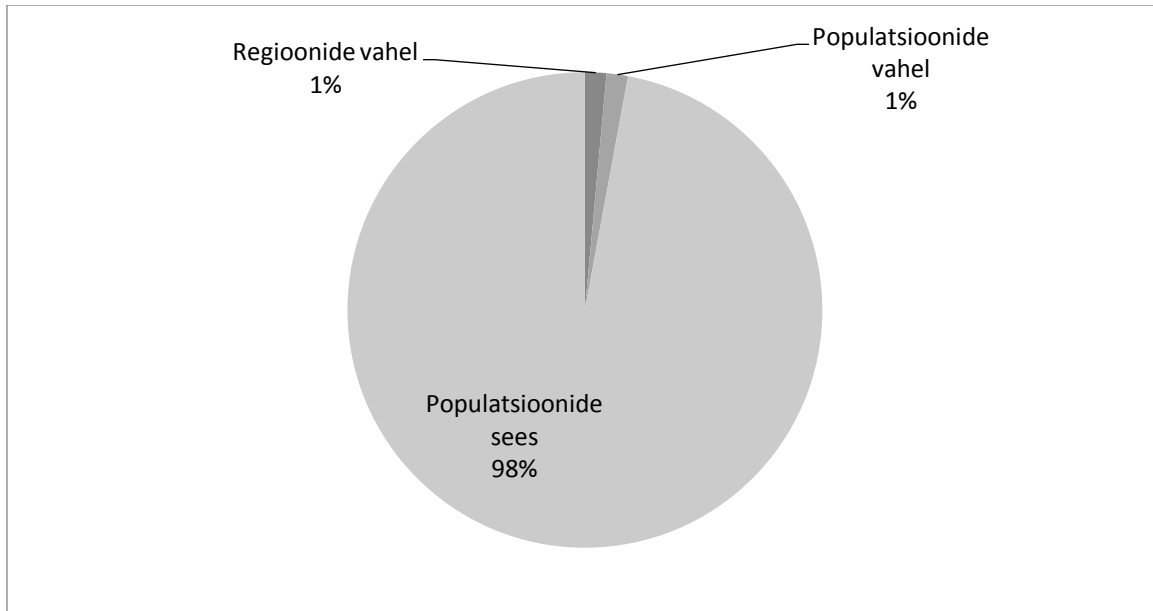
Tabel 8. Uuritud populatsioonide geneetilist varieeruvust kirjeldavad näitajad. N – proovide arv, G – genotüüpide arv, M – unikaalsete genotüüpide protsent populatsioonis, A – alleelide mitmekesisus, I – Shannoni indeks, H – Nei tasakaalustamata geneetiline mitmekesisus, P – unikaalsete alleelide arv, C – minimaalne koloniseerimissündmuste arv populatsioonis

Pop nr	N	G	M	A	I	H	P	C
1	46	38	0,83	5,44	1,91	0,59	1	8
2	30	27	0,90	5,11	1,96	0,61	2	9
3	36	31	0,86	5,56	1,26	0,63	1	10
4	60	48	0,80	6,22	1,36	0,66	3	11
5	38	30	0,79	5,90	1,29	0,62	2	8
6	50	43	0,86	5,78	1,25	0,62	3	9
7	59	46	0,78	6,11	1,32	0,64	2	11
<b>Kokku</b>	319	213						

Üheksa lookuse põhjal ei leidunud genotüüpi, mis oleks esinenud nii Põhja- kui Lõuna-Eestis. Lõuna-Eestist leiti 3 eksemplari, mis esinesid kõigis populatsioonides, enim unikaalseid genotüüpe (3) leidis populatsioonis nr 3. Populatsioonide nr 1 ja 2 vahel leiti 3 unikaalset klooni (ei esinenud kolmandas populatsioonis), kuid alad 2 ja 3 unikaalseid kloone ei jaganud. Põhja-Eestist leiti ainult üks genotüüp, mis esines kõigil aladel ning kõige rohkem ühiseid genotüüpe esines aladel nr 4, 6 ja 7.

### 3.5. Hierarhiline AMOVA analüüs

Hierarhilise AMOVA analüüsi põhjal on näha geneetilise varieeruvuse jaotumist regioonide, populatsioonide ja isendite vahel. Kogu geneetilisest varieeruvusest 98% kirjeldab indiviidide varieeruvus populatsioonide sees ( $p < 0,005$ ) ning 1% varieeruvus regioonide vahel ( $p < 0,005$ ; Joonis 3, Tabel 9). Populatsioonide vaheline varieeruvus (1%) ei osutunud statistiliselt oluliseks ( $p = 0,095$ ; Tabel 9).



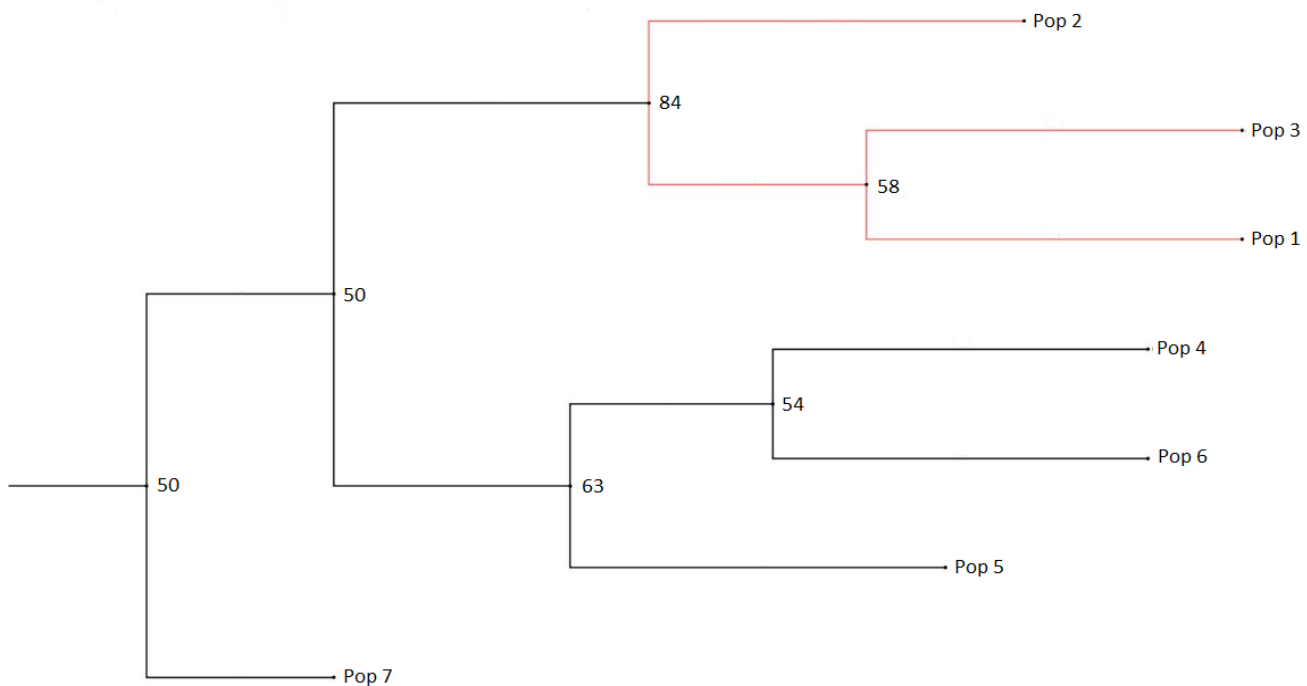
Joonis 3. Geneetilise varieeruvuse jaotumine tasemete vahel (AMOVA analüüs).

Tabel 9. AMOVA analüüs, df – vabadusastmete arv, SS – ruutude summa. MS – SS/df, Phi statistikud näitavad geneetilise mitmekesisuse jaotumine taseme vahel võrreldes summaarse varieeruvusega, P- statistiline olulisus, arvatatud 999 permutatsiooni alusel

Varieeruvuse tase	df	SS	MS	Varieeruvuse osakaal	Phi	P
<b>Regioonide vahel</b>	1	2538,7	2538,7	1%	0,015	<0,005
<b>Populatsioonide vahel</b>	5	4807,8	961,6	1%	0,007	0,095
<b>Populatsioonide sees</b>	312	227466,9	729,1	98%	0,022	<0,005
<b>Kokku</b>	318	234813,3		100%		

### 3.6. UPMGA dendrogramm

Visualiseerimaks populatsioonide omavahelist seotust viidi läbi klasteranalüüs. 100 dendrogrammi baasil koostati üks konsensuspuu. Dendrogrammil on näha, et regioonide sisesed populatsioonid klasterduvad suurema tõenäosusega omavahel kokku, Põhja-Eesti populatsioonid eristuvad Lõuna-Eesti omadest pooltel juhtudel (Joonis 4).



Joonis 4. Tasakaalustamata Nei geneetiliste distantside maatriksite põhjal koostatud konsensuspuu. Numbrid jagunemise kohtadel näitavad, mitmel korral sajast harunemine aset leidis.

### 3.7. Populatsioonide geneetiliste distantside paarikaupa võrdlus

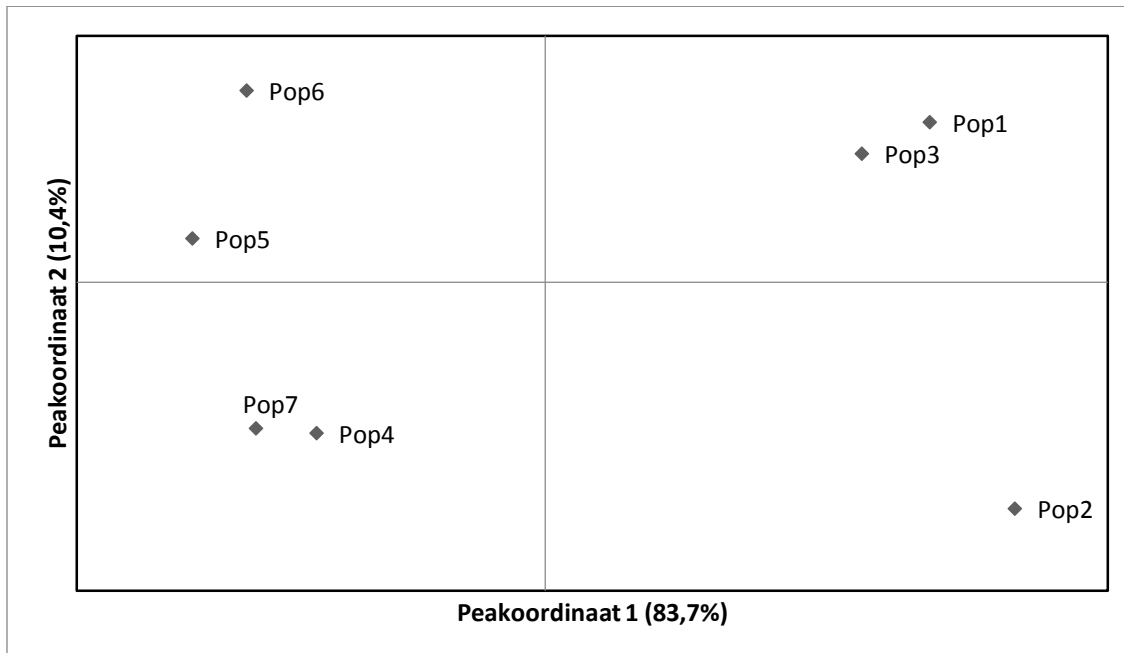
Võrreldes populatsioonide Nei geneetilisi distantse paarikaupa, selgub, et Lõuna-Eesti populatsioonid erinevad üksteisest keskmiselt 0,052; Põhja Eesti populatsioonid keskmiselt 0,034 ning suurim erinevus esineb regioonide vahel (0,232). Kõige lähedasemad on üksteisele Lõuna-Eesti populatsioonid nr 6 ja 7 ning kõige erinevamad populatsioon nr 3 Põhja-Eestist ja populatsioon nr 5 Lõuna-Eestist (Tabel 10).

Tabel 10. Populatsioonide Nei geneetiliste distantside paarikaupa võrdlus. Regioonide kaupa võrreldud populatsioonid on joonega eraldatud.

Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	
0,000							<b>Pop1</b>
0,062	0,000						<b>Pop2</b>
0,033	0,062	0,000					<b>Pop3</b>
0,229	0,258	0,248	0,000				<b>Pop4</b>
0,224	0,245	0,267	0,054	0,000			<b>Pop5</b>
0,205	0,259	0,225	0,030	0,040	0,000		<b>Pop6</b>
0,191	0,222	0,212	0,026	0,034	0,022	0,000	<b>Pop7</b>

### 3.8. Populatsioonide peakomponentanalüüs

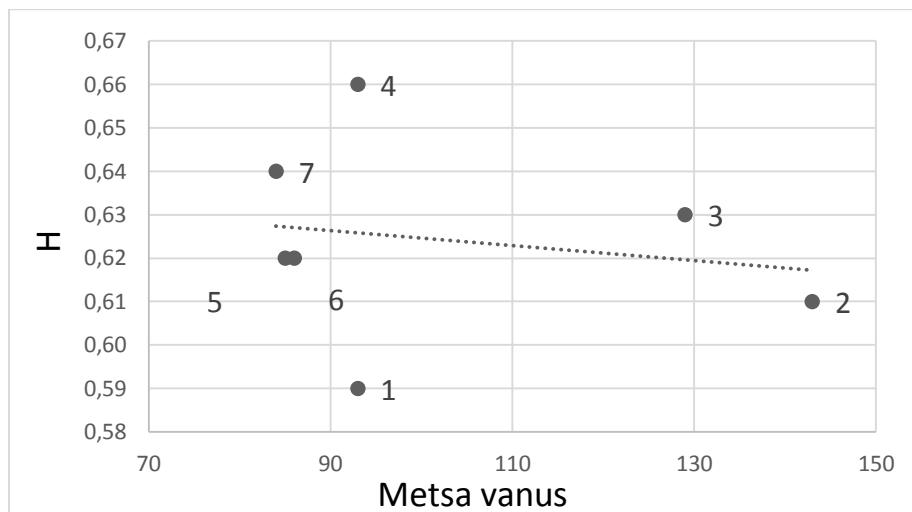
Populatsioonide peakomponentanalüüsi tulemused on esitatud kahemõõtmelises koordinaatteljestikus, kus kaks esimest peakomponenti kirjeldavad kokku 94,1% varieeruvusest (Joonis 5). Analüüsil eristuvad Põhja-Eesti populatsioonid (1 – 3) selgelt Lõuna-Eesti omadest (4 – 7). Kõige lähemalt on seotud populatsioonid nr 1 ja 3.



Joonis 5. Populatsioonide peakomponentanalüüs vars-habesambliku 9 mikrosatelliitmarkeri põhjal.

### 3.9. Regressiooni mudeli analüüs

Regressioonimudeli analüüsi põhjal leiti positiivne seos geneetilise mitmekesisuse (H) ja mändide osakaalu vahel esimes rindes ning negatiivne seos geneetilise mitmekesisuse (H) ja metsa vanuse vahel (joonis 6), ükski tulemus ei osutunud statistiliselt oluliseks ( $p < 0,05$ ).



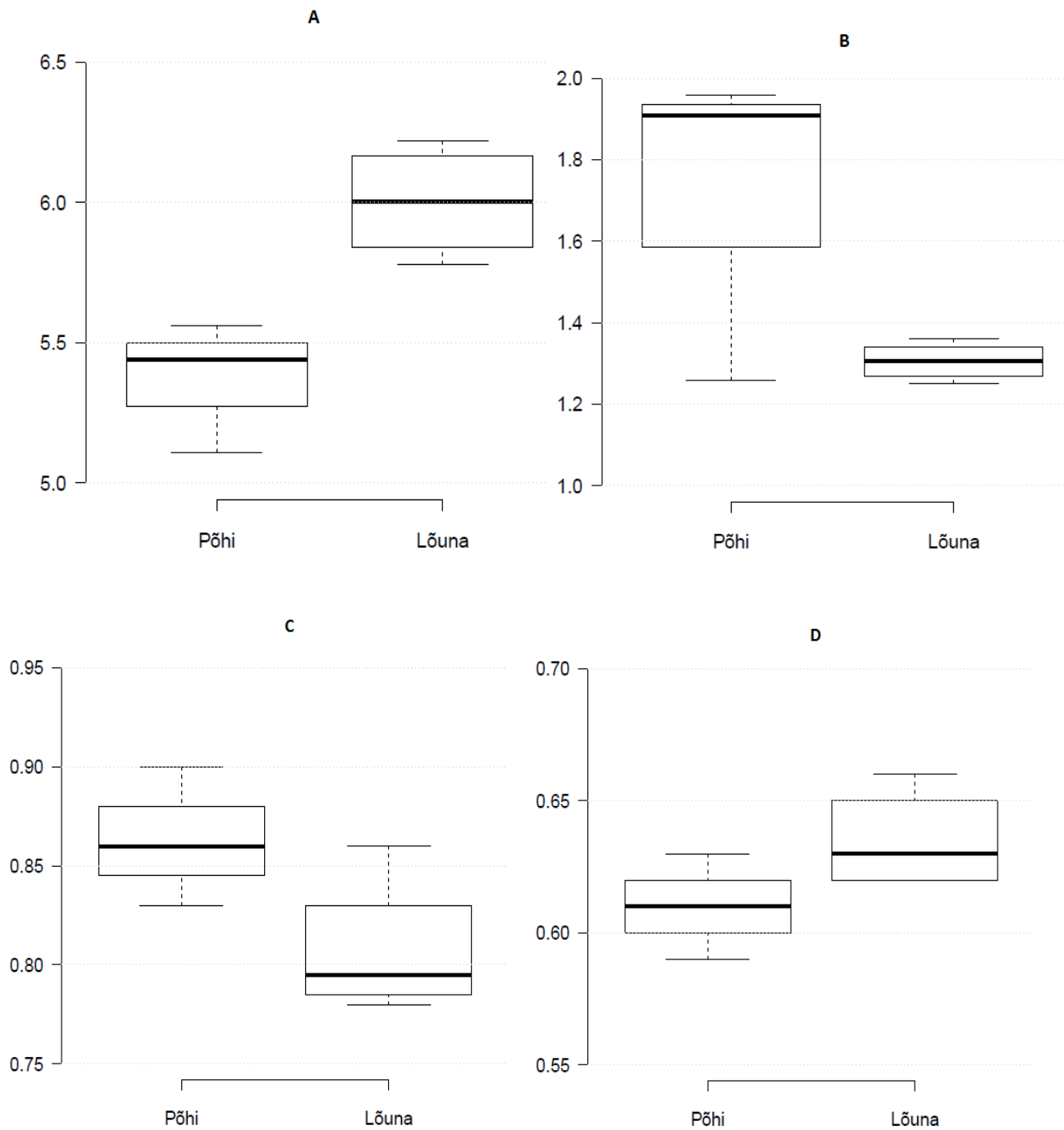
Joonis 6. Regressioonianalüüs. Geneetilise mitmekesisuse (H) seos metsa vanusega, statistiliselt ebaoluline ( $p > 0,01$ ). Numbrid tähistavad populatsioone.

### 3.10. Erinevused regioonide vahel

T-testi tulemuste alusel erinevad regiooniti alleelide mitmekesisus (A) ja Shannoni indeks (I). Multilookus genotüüpide osakaal on kõrgem Põhja-Eestis, kuid erinevus ei ole statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ) ning kemotüübid jagunevad mõlemas regioonis sarnaselt (Tabel 11, Joonis 7).

Tabel 11. Regioonide vahelised erinevused. P-E – Põhja-Eesti; L-E – Lõuna-Eesti, lookuse kohta, I – Shannoni indeks, A – alleelide mitmekesisus, SQU – skvamaathappega kemotüüpide osakaal, n.s – statistiliselt ebaoluline

Regioon	A $p < 0,05$	I $p < 0,05$	M $p = n.s$	SQU $p = n.s$
P-E	5,37	1,71	0,86	53,3%
L-E	6,00	1,31	0,81	55,1%



Joonis 7. Alleelide mitmekesisuse (A;  $p < 0,05$ ), Shannoni indeksi (B;  $p < 0,05$ ), multilookus genotüüpide osakaalu (C;  $p =$  statistiliselt ebaoluline) ja Nei tasakaalustamata geneetilise mitmekesisuse (D;  $p =$  statistiliselt ebaoluline) võrdlus Põhja-Eesti (Põhi) ja Lõuna-Eesti (Lõuna) vahel. Tüese joon – mediaan, karbi ülemine ja alumine serv – 25% ja 75% kvantilid, vurrud – valimi suurim ja väikseim väärtus

## **4. Arutelu**

### **4.1. Töö olulisus**

Aina enam pööratakse tähelepanu samblikke moodustavate seente geneetilisele varieeruvusele, kuid valdav enamus avaldatud töid keskendub haruldastele või endeemsetele liikidele (Jones *et al.* 2012; Scheidegger *et al.* 2012; Devkota *et al.* 2014) ning vähe on teada laia levikuga sageli esinevate parasvöötme liikide geneetilise varieeruvuse kohta. Üks selline liik on *Usnea subfloridana*, millele on alles hiljuti välja töötatud liigispetsiifilised praimerid (Tõrra *et al.* 2014), kuid seni pole trükis ilmunud veel ühtegi tööd, kus neid primereid oleks kasutatud. Seega käesolev uurimus annab, esiteks, esmakordselt andmeid selle liigi geneetilise mitmekesisuse kohta ning, teiseks, praktilisi täiendusi praimerite kasutamise ja laboratoorste protseduuride kohta. Lisaks vaadeldakse nimetatud epifüüdi geneetilise mitmekesisuse seoseid erinevate metsanduslike parameetritega.

### **4.2. Metoodilised uuendused**

Oluliseim muudatus võrreldes varasema tööga (Tõrra *et al.* 2014) on vastassuunaliste (*reverse*) praimerite muutmise komplementarsuprintsiibi põhimõttel (Tabel 4). Varem avaldatud vastassuunalised (*reverse*) praimerid (Tabel 3) olid otse genoomist kopeeritud sekventsidsid ning ei amplifitseerinud vajalikke järjestusi. Teine oluline muudatus on PCR termostsükleri programmi muutmise ühe praimerisegu puhul (ptk 2.6.), lisaks modifitseeriti DNA-eraldamise protokoll (Lisa 2).

### **4.3. Markerite varieeruvus**

Kõik kasutatud markerid olid polümorfseid, enim allelele tuvastati lookuses Us01 (15), kõige vähem allelele oli lookuses Us04 (4). Võrreldes saadud tulemusi Tõrra *et al.* (2014) tulemustuga tuvastati erinevus lookuste varieeruvuses, enim erinesid lookused Us02 ja Us05, sarnase varieeruvuste vahemik esines lookustes Us01 ja Us09 (Tabel 3, Tabel 4). Nei tasakaalustamata geneetilises mitmekesisuses lookuse kohta märkimisväärseid erinevusi ei täheldatud. Tõrra kaasautoritega (2014) kasutas 174 eksemplari, mis pärinesid Eestist, Põlva maakonnast. Käesolevas magistritöös kasutati vähendatud hulgal andmeid samadest populatsioonidest ning

lisaks ühest populatsioonist, mis Tõrra *et al.* (2014) artiklis ei kajastunud, ning kolmest populatsioonist Põhja-Eestist.

#### 4.4. Geneetiline mitmekesisus *Usnea subfloridana* populatsioonide sees

Varieeruvus populatsioonide sees oli kõrge, kokku tuvastati 77 alleeli, keskmiselt 5,73 alleeli lookuses populatsiooni kohta. Tuvastati 14 populatsioonispetsiifilist alleeli, keskmiselt kaks alleeli populatsiooni kohta. Nei tasakaalustamata geneetiline mitmekesisus ( $H$ ) oli samuti suhteliselt kõrge (0,62). Neile näitajatele hinnangu andmiseks on neid võimalik võrrelda mõnede teiste samblikke moodustavate seente analoogsete näitajatega (Tabel 12). Võrreldes nende tulemustega on käesolevas töös leitud geneetiline mitmekesisus kõrgem, samas pole Eestis uuritud alade kohta teada suureskaalalisi häiringuid. Lisaks on võrdluseks kasutatud *Lobaria pulmonaria* paljudes Euroopa riikides ohustatud või haruldane ning selliste fragmenteeritud levilaga liikide populatsioonides on sageli probleemiks geneetilise varieeruvuse vähenemine ning intensiivne inbriiding. *Usnea subfloridana* seevastu on laia levikuga, ökoloogiliselt vähenõudlik ja sagedane liik, seega, hoolimata peamiselt vegetatiivsest paljunemisviisist, võib oodata kõrgeid geneetilise mitmekesisuse näitajaid. *Lobaria pulmonaria* kõrge geneetilise mitmekesisuse ( $H=0,62$ ,  $A=7,7$ ) tuvastas Nadyeina kaasautoritega (2014b) suurepindalisest (10 000 ha) ürgmetsast (Uholka–Shyrokyi Luh, Ukraina), mida pole tõenäoliselt sajandeid häiritud.

*Parmelina tiliacea* on teine laialt levinud lihheniseerunud seene liik, millega on geneetilised uuringud läbi viidud. Núñez-Zapata kaasautoritega (2015) leidsid, et see liik jaguneb Euroopas kolmeks haplotüübiks, kusjuures enim eristus teistest Kanaari saari hõlmanud Vahemere ranniku piirkond, kuid kontinendil paiknenud regioonide vahel täheldati madalaid Fst väärtusi. Lisaks selgus, et populatsioonid on differentseerunud laiguti, kuid üle Euroopa ei ole näha selget differentseerumise gradienti. Sarnaselt võib *U. subfloridana* geneetilise varieeruvuse uurimine Eesti piires olla ebasobiva lahutusvõimega skaala ning vaja oleks suuremamahulisi uuringuid.



Tabel 12. *Lobaria pulmonaria* geneetilise varieeruvuse näitajad. H – Nei tasakaalustamata geneetiline mitmekesisus, A – keskmine alleelide arv lookuses

H	A	Regioon	Viide
0,56	7,46	Norra	Hilmo <i>et al.</i> 2012
0,5	5,09	Kagu-Euroopa	Scheidegger <i>et al.</i> 2012
0,62	7,7	Ukraina	Nadyeina <i>et al.</i> 2014a
0,48	5,08	Hispaania	Otalora <i>et al.</i> 2015
0,49 – 0,51*	6,20 – 9,09*	Šveits	Singh <i>et al.</i> 2015

\*Võrreldi kolme tüüpi metsahäiringuid

#### 4.5. Geneetiline mitmekesisus populatsioonide vahel ja geenisiire

Suurima osa geneetilisest varieeruvusest seletas varieeruvus indiviidide vahel, uuritud populatsioonid omavahel AMOVA analüüsi tulemusel oluliselt ei erinenud, mis tähendab, et kuigi kõrge geneetilise mitmekesisusega, on populatsioonid üksteisega pigem sarnased. Väikese (1%), kuid statistiliselt olulise osa seletas erinevus regioonide vahel, seega populatsioonid samast regioonist on üksteisega sarnasemad kui eri regioonidest. Sarnase tulemuse sai Hilmo kaasautoritega (2012) uurides kolme *Lobaria pulmonaria* populatsiooni (vahemaa 1,8 – 27,1 km) Norra metsades, 94% varieeruvusest seletas varieeruvus indiviidide vahel.

Mikrosatelliit-analüüsi tulemused näitavad, et uuritud populatsioonide geneetilise mitmekesisuse parameetrid populatsiooniti ei varieeru väga suures ulatuses. Suurim geneetiline varieeruvus esineb populatsioonis nr 4, kus alleelide mitmekesisus lookuses (A) oli 6,22. Väikseim alleelide mitmekesisus lookuses leiti populatsioonis nr 2 (A = 5,11).

Populatsioonide peakomponentanalüüs, Nei geneetiliste distantide paariviisiline võrdlus (Tabel 10) ning UPMGA dendrogramm näitavad (Joonis 4), et regioonide siseselt on populatsioonid üksteisega sarnasemad kui eri regioonides paiknevad populatsioonid. Nei geneetiliste distantide paariviisiline võrdlus näitab, et populatsioonid samast regioonist on väga vähe eristunud ( $F_{st} = 0,02 - 0,06$ ), samas eri regioonides paiknevate populatsioonide geneetiline distant on suurem ( $F_{st} = 0,19 - 0,27$ ). Madalad  $F_{st}$  väärtused regioonide sees annavad märku geenivoolust uuritud alade vahel ja kõrgemad väärtused selle puudumisest või toimumisest oluliselt väiksemas matus.  $F_{st}$  väärtus 0,2 tähendab Avise ja Moritzi (1993) järgi

teoreetiliselt piisavat geenivoolu, et ennetada oluliselt geneetilist differentseerumist, samas kui Hartl (1998) leiab, et sama väärtus põhjustab "suure geneetilise eristumise". Ülevaatlikus artiklis leiavad Morjan ja Rieseberg (2004), et seentega läbi viidud geenivoolu uuringutes Fst väärtus 0,2 näitab madalat kuni keskmist geenivoolu.

Kuna *Usnea subfloridana* on suhteliselt tavaline liik kogu Euroopas, võiks oletada, et see pole kauglevimise poolt piiratud. Kuna regiooniti esineb populatsioonide vahel kloone, kuid regioonide vahel kloone ei esine, võib oletada, et vegetatiivsed levised nii kaugele ei levi. Selgitamaks välja, kas regioonide vahel esineb levimisbarjäär, oleks vaja koguda täiendavaid andmeid Kesk-Eesti aladelt. Nadyeina kaasautoritega (2014c) arvutas *Lobaria pulmonaria* efektiivseks levimiskauguseks populatsioonis 30 ja enam meetrit, samas kui Grande *et al.* (2012) leidsid, et vegetatiivne levimine mõjutab liigi geneetilist struktuuri eelkõige distantidel, mis on lühemad kui 20m. Hilmo kaasautoritega (2012) tuvastas 8 mikrosatelliitmarkeri põhjal genotüübi, mille isendid paiknesid üksteisest 135 m kaugusel. Buschbom (2007) leidis, et liigi *Porpidia flavicunda* puhul toimub intensiivne geenivahetus Gröönimaa ja Põhja-Euroopa vahel. Hilmo kaasautoritega (2012) näitas, et *Lobaria pulmonaria* puhul Norra metsades on omavahel ühendatud populatsioonid, mis paiknevad üksteisele lähemal kui 30 km. Käesolevas töös esines kõige suurem identsete genotüüpide (genotüübid, mida ei leidunud teistes populatsioonides) kaugus populatsioonide 6 ja 7 vahel, mis paiknesid teineteisest 4 km kaugusel, nende populatsioonide vahel esines 4 erinevat genotüübi paari. Geneetilised distantide maatriks näitas, et need populatsioonid on omavahel kõige lähedasemad.

#### **4.6. Erinevused regioonide vahel ja seosed metsanduslike parameetritega**

Lõuna-Eestis oli kõrgem alleelide mitmekesisus populatsiooni kohta (A; t-test –  $p < 0,05$ ), samas kui Põhja-Eestis oli kõrgem Shannoni indeks (I; t-test –  $p < 0,05$ ). Shannoni indeks võtab arvesse kõigi genotüüpide arvu ja esinemissagedust. Multilookuseliste genotüüpide protsent populatsiooni kohta oli kõrgem Põhja-Eestis, kuid erinevus ei olnud statistiliselt oluline (Tabel 13), samuti oli geneetiline mitmekesisus (H) sarnane mõlemas regioonis (Joonis 8). Ka kemotüüpide jaotuses ei esinenud regioonide vahel olulisi erinevusi (Tabel 11). Kokkuvõtlikult

võib öelda, et mitmekesisus on jaotunud ühtlaselt ja üks regioon ei ole teisest mitmekesisem või looduskaitse seisukohalt olulisem.

Samblikke moodustava seene geneetiline mitmekesisus (H) ühegi metsandusliku parameetriga statistiliselt oluliselt ei seostunud. Varasemalt on näidatud positiivseid seoseid metsa vanuse (Otalora *et al.* 2011; Giorgio *et al.* 2015;) ja puude diameetriga (Belinchón *et al.* 2009). Lisaks on näidatud, et muutused peapuuliigis avaldavad mõju epifüütse lihheniseerunud seene geneetilisele mitmekesisusele (Werth *et al.* 2006).

### **Kokkuvõte**

Käesoleva töö eesmärgiks oli hinnata laia levikuga lihheniseerunud seene *Usnea subfloridana* geneetilist varieeruvust Põhja- ja Lõuna Eestis ning selgitada välja, kui suur on selle liigi geneetiline mitmekesisus eri tasanditel, sh regioonide tasandil ning kas esineb seoseid metsa struktuuri ja geneetilise mitmekesisuse vahel. Püstitati kaks hüpoteesi: (1) regioonid on geneetiliselt eristunud; (2) geneetiline mitmekesisus on positiivselt seotud metsa vanusega. Analüüsiti 314 isendit 7 populatsioonist kasutades 9 mikrosatelliitset markerit. Laboratoorsete tööde käigus tehti olulisi muudatusi praimerite nukleotiidses järjestustes. Leiti, et hoolimata vegetatiivsest paljunemisviisist on *Usnea subfloridana* geneetiline mitmekesisus uuritud aladel väga kõrge, see on võrreldav ürgmetsas kasvavate suguliselt paljunevate samblike populatsioonide geneetilise mitmekesisusega. Esimene hüpotees leidis osaliselt kinnitust, regioonide vaheline erinevus seletas väikese osa geneetilisest koguvarieeruvusest ning eri regioonides ei esinenud ühiseid klonaaliseid genotüüpe. Peakomponentanalüüsil ning populatsioonide geneetiliste distantside võrdlusel leiti märgatav erinevus regioonide vahel. Suurima osa geneetilisest varieeruvusest seletas siiski erinevus isendite vahel. Seega geneetiline varieeruvus jaguneb ühtlaselt ning populatsioonid on üksteisega osaliselt sarnased. Mõistmaks laia levikuga sagedase lihheniseerunud seene geneetilisi mustreid võib osutada vajalikuks suuremaskaalaliste uuringute läbiviimine. Geneetilise mitmekesisuse ja metsanduslike parameetrite vahel statistiliselt olulisi seoseid ei leitud. Suur kloonide osakaal populatsioonide vahel viitab, et distantssidel 1 – 10 km ei ole *U. subfloridana* levimine piiratud.

## Summary

The aim of this study was to evaluate genetic diversity of the widespread lichenized fungus *Usnea subfloridana* in North and South Estonia, to estimate the degree of genetic diversity of this species on different levels, including regional level, and to find the relationships between genetic diversity of *U. subfloridana* and forest characteristics. Two hypotheses were set up: (1) the two studied regions are genetically differentiated; (2) genetic diversity is positively correlated with age of forest. The 314 samples from 7 populations were analyzed using nine microsatellite markers. The reverse primers for 9 microsatellite loci of *U. subfloridana* were corrected. It was found that regardless of mainly vegetative dispersal mode, genetic diversity of *U. subfloridana* populations was very high in studied areas and is comparable with sexually reproducing populations of other lichenized taxa in primeval forest. The first hypothesis, was partially proved as variation between regions explained small part of total variation, and no joint clonal genotypes were found in different regions. PCoA and pairwise comparison of genetic distances showed that regions are considerably different. The highest part of variation was explained by variation between the individuals. Therefore, genetic variation is divided evenly and populations are partially similar with each other. To understand the genetic patterns of frequent and widespread lichenized fungi, additional research covering bigger areas is needed. No statistically significant correlations between genetic diversity and forest characteristics were found in this study. High percentage of multilocus genotypes indicates that the species is not restricted by dispersal within the distances 1 – 10 km.

## Tänuavaldused

Täna oma juhendajaid Tiina Randlast ja Polina Degtjarenkot asjalike kommentaaride eest ning Polinat emotsionaalse toetuse ja viljakate vestluste eest, Rasmus Puusseppa abi eest laboratoorsetel analüüsidel ning Ailar Pokki abi eest statistikaprogrammide kasutamisel.

## Kasutatud kirjandus

- Alors, D., Grande F., Schmitt, I., Kraichak, E., Lumbsch, H. T., Crespo, A., Divakar P., K. 2014. Characterization of fungus-specific microsatellite markers in the lichen-forming fungus *Parmelina Carporrhizans* (Parmeliaceae). *Applications in Plant Sciences* 2: 1 – 6.
- Armaleo, D., Zhang Y., Cheung, S. 2008. Light might regulate divergently depside and depsidone accumulation in the lichen *Parmotrema hypotropum* by affecting thallus temperature and water potential. *Mycologia* 100: 565 – 576.
- Articus, K., Mattsson, J-E., Tibell, L., Grube, M., Wedin, M. 2002. Ribosomal DNA and  $\beta$ -tubulin data do not support the separation of the lichens *Usnea florida* and *U. subfloridana* as distinct species. *Mycological Research* 106: 412 – 418.
- Avise, J. C., Moritz, C. 1993. Molecular markers natural history and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 499 – 499.
- Balarinová, K., Váczi, P., Barták, M., Hazdrová, J., Forbelská, M. 2013. Temperature-dependent growth rate and photosynthetic performance of Antarctic symbiotic alga *Trebouxia Sp.* cultivated in a bioreactor. *Czech Polar Reports* 3: 19 – 27.
- Belinchón, R., Martínez, I., Otálora, M., Aragón, G., Dimas, J., Escudero, A. 2009. Fragment quality and matrix affect epiphytic performance in a Mediterranean forest landscape. *American Journal of Botany* 96: 1974 – 1982.
- Belinchón, R., Ellis, C. J., Yahr, R. 2014. Microsatellite loci in two epiphytic lichens with contrasting dispersal mode: *Nephroma laevigatum* and *N. parile* (Nephromataceae). *Applications in Plant Sciences* 2: 1 – 4.
- Bimboim, H. C., Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513 – 1523.
- Bjerke, J. W., Elvebakk, A., Domínguez, E., Dahlback, A. 2005. Seasonal trends in usnic acid concentrations of Arctic, alpine and Patagonian populations of the lichen *Flavocetraria nivalis*. *Phytochemistry* 66: 337 – 344.
- Buschbom, J. 2007. Migration between continents: geographical structure and long-distance gene flow in *Porpidia flavicunda* (lichen-forming Ascomycota). *Molecular Ecology* 16: 1835 – 1846.

- Clerc, P. Contribution à la revision de la systématique des Usnées (*Ascomycotina, Usnea*) d'Europe. I. *Usnea florida* (L.) Wigg. emend. Clerc. 1984. *Cryptogamie, Bryologie et Lichenologie*. 5: 333 – 60.
- Clerc, P. 1998. Species concepts in the genus *Usnea* (lichenized *Ascomycetes*). *The Lichenologist* 30: 321 – 340.
- Crespo, A., Cubero, O. F., Grube, M. 1998. PCR application in studies of lichen-forming fungi. In: Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P. (koostajad). Applications of PCR in Mycology, CABI, Wallingford, 85 – 105.
- Culberson, L. W. 1986. Chemistry and sibling speciation in the lichen-forming fungi: ecological and biological considerations. *Bryologist* 89: 123 – 131.
- Culberson, L. W., Culberson, C. F. 1994. Secondary metabolites as a tool in ascomycete systematics: lichenized fungi. *Ascomycete Systematics*. NATO ASI series. Series A, Life sciences, 155 – 163.
- Culberson C. F., Culberson W.L., Johnson A. 1993. Occurrence and histological distribution of usnic acid in the *Ramalina siliquosa* species complex. *Bryologist* 1: 181 – 4.
- Devkota, S., Cornejo, C., Werth, S., Chaudhary, R. P., Scheidegger, C. 2014. Characterization of microsatellite loci in the Himalayan lichen fungus *Lobaria Pindarensis* (Lobariaceae). *Applications in Plant Sciences* 2: 1 – 4.
- Dieringer, D., Schlötterer, C. 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3. 1: 167 – 169.
- Dillenius, J. J. 1742. *Historia muscorum. Trichaceae, Musci in Southeast Asia*. *J. Hattori Botanical Laboratory* 72: 1 – 88.
- Dudaniec, R. Y., Storfer, A., Spear, S. F., Richardson, J. S. 2010. New microsatellite markers for examining genetic variation in peripheral and core populations of the coastal giant salamander (*Dicamptodon tenebrosus*). *PloS One* 5: 1 – 4.
- Felsenstein, J. 2013. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.695. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe., D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge, Cambridge University Press.

- Gauslaa, Y., McEvoy, M. 2005. Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen *Xanthoria parietina*. *Basic and Applied Ecology* 6 : 75 – 82.
- Giorgio, B., Luisa, F., Sonia, R. 2015. Structural variables drive the distribution of the sensitive lichen *Lobaria pulmonaria* in Mediterranean old-growth forests. *Ecological Indicators* 53: 37 – 42.
- Grande, F., Beck, A., Singh, G., Schmitt, I. 2013. Microsatellite primers in the lichen symbiotic alga *Trebouxia decolorans* (*Trebouxiophyceae*). *Applications in Plant Sciences* 1: 1 – 4.
- Grande, F., Widmer, I., Wagner, H. H., Scheidegger, C. 2012. Vertical and horizontal photobiont transmission within populations of a lichen symbiosis. *Molecular ecology* 21: 3159-3172.
- Guzow-Krzeminska, B., Stocker-Wörgötter, E. 2013. Development of microsatellite markers in *Protoparmeliopsis muralis* (lichenized *Ascomycete*) – a common lichen species. *The Lichenologist* 45: 791 – 798.
- Halonen, P., Clerc, P., Goward, T., Brodo, I. M., Wulff, K. 1998. Synopsis of the genus *Usnea* (lichenized *Ascomycetes*) in British Columbia, Canada. *Bryologist* 101: 36 – 60.
- Halonen, P., Myllys, L., Ahti, T., Petrova, O. V. 1999. The lichen genus *Usnea* in East Fennoscandia. III. The shrubby species. *Annales Botanici Fennici* 36: 235 – 256.
- Hartl, D. L. 1998. A Primer of population genetics. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.
- Hilmo, O., Lundemo, S., Holien, H., Stengrundet, K., Stenøien, H. K. 2012. Genetic structure in a fragmented Northern Hemisphere rainforest: large effective sizes and high connectivity among populations of the epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria*. *Molecular Ecology* 21: 3250 – 3265.
- Honegger, R., Zippler U., Gansner H., Scherrer, S. 2004. Mating systems in the genus *Xanthoria* (lichen-forming *Ascomycetes*). *Mycological Research* 108: 480 – 488.
- Jarne, P., Lagoda, P. J. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 424 – 429.
- Jones, T. C., Green, T. G., Hogg, I. D., Wilkins, R. J. 2012. Isolation and characterization of microsatellites in the lichen *Buellia frigida* (*Physciaceae*), an Antarctic endemic. *American Journal of Botany* 99: 131 – 133.

- Jüriado, I., Liira, J., Csencsics, D., Widmer, I., Adolf, C., Kohv, K., Scheidegger, C. 2011. Dispersal ecology of the endangered woodland lichen *Lobaria pulmonaria* in managed hemiboreal forest landscape. *Biodiversity and Conservation* 20: 1803 – 1819.
- Kalwij, J. M., Wagner, H. H., Scheidegger, C. 2005. Effects of stand-level disturbances on the spatial distribution of a lichen indicator. *Ecological Applications* 15: 2015 – 2024.
- Kelly, L. J., Hollingsworth, P. M., Coppins, B. J., Ellis, C. J., Harrold, P., Tosh, J., Yahr, R. 2011. DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytologist* 191: 288 – 300.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., Stalpers, J. A. 2008. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. Wallingford, Cabi.
- Kraichak, E., Divakar, P. K., Crespo, A., Leavitt, S. D., Nelsen, M. P., Lücking, R., Lumbsch, H. T. 2015. A Tale of Two hyper-diversities: Diversification dynamics of the two largest families of lichenized fungi. *Scientific Reports* 5: 1 – 9.
- Magain, N., Forrest, L. L., Sérusiaux, E., Goffinet, B. 2010. Microsatellite primers in the *Peltigera dolichorhiza* complex (lichenized ascomycete, Peltigerales). *American Journal of Botany* 97: 102 – 104.
- Magurran, A. E. 2004. Measuring biological diversity. New York, John Wiley & Sons.
- Mansournia, M. R., Bingyun, W. U., Matsushita, N., Hogetsu, T. 2012. Genotypic analysis of the foliose lichen *Parmotrema tinctorum* using microsatellite markers: association of mycobiont and photobiont, and their reproductive modes. *The Lichenologist* 44: 419 – 440.
- Maretto, F., Szwaczkowski, T., Rossi, G., Marchi, M., Rutkowski, A., Cassandro, M. 2013. Genetic diversity of old chicken breeds kept in Poland. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 78: 197 – 200.
- Mark, K., L., Leavitt, S. D., Will-Wolf, S., Nelsen, M. P., Tõrra, T., Saag, A., Randlane, T., Lumbsch, H. T. 2016. Evaluation of traditionally circumscribed species in the lichen-forming genus *Usnea*, section *Usnea* (*Parmeliaceae*, *Ascomycota*) using a six-locus dataset. *Organisms Diversity & Evolution* 1 – 28. DOI: 10.1007/s13127-016-0273-7
- Miao, V., Coëffet-LeGal, M. F., Brown, D., Sinnemann, S., Donaldson, G., Davies, J. 2001. Genetic approaches to harvesting lichen products. *TRENDS in Biotechnology*. 19: 349 – 355.



- Morjan, C. L., Rieseberg H. R. 2004. How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Molecular Ecology* 13: 1341 – 1356.
- Murtagh, G. J., Dyer, P. S., McClure, P. C., Crittenden, P. D. 1999. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers as a tool to study variation in lichen-forming fungi. *The Lichenologist* 31: 257 – 267.
- Nadyeina, O., Cornejo, C., Boluda, C. G., Myllys, L., Rico, V. J., Crespo, A., Scheidegger, C. 2014a. Characterization of microsatellite loci in lichen-forming fungi of *Bryoria* section complex (*Parmeliaceae*). *Applications in Plant Sciences* 2: 1 – 4.
- Nadyeina, O., Dymytrva, L., Naumovych, A., Postoyalkin, S., Werth, S., Cheenacharoen, S., Scheidegger, C. 2014b. Microclimatic differentiation of gene pools in the *Lobaria pulmonaria* symbiosis in a primeval forest landscape. *Molecular ecology* 23: 5164 – 5178.
- Nadyeina, O., Dymytrva, L., Naumovych, A., Postoyalkin, S., Scheidegger, C. 2014c. Distribution and dispersal ecology of *Lobaria pulmonaria* in the largest primeval beech forest of Europe. *Biodiversity and Conservation* 23: 3241 – 3262.
- Nascimbene, J., Thor, G., Nimis, P. L. 2013. Effects of forest management on epiphytic lichens in temperate deciduous forests of Europe – A review. *Forest Ecology and Management* 298: 27 – 38.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583 – 590.
- Norse, E., Wilcove, K. L., Wilcox, D. S., Norse, B. A., Rosenbaum, K. L. 1986. Conserving biological diversity in our national forests. Washington, The Wilderness Society.
- Núñez-Zapata, J, Cubas, P., Hawksworth, D. L., Crespo, A. 2015. Biogeography and genetic structure in populations of a widespread lichen (*Parmelina tiliacea*, *Parmeliaceae*, *Ascomycota*). *PloS One* 10: 1 – 17.
- Otalora, M., Belinchón, R., Prieto, M., Aragón, G., Izquierdo, P., Martínez, I. 2015. The threatened epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* in the Iberian Peninsula: genetic diversity and structure across a latitudinal gradient. *Fungal Biology* 119: 802 – 811.
- Otalora, M., Martínez, I., Belinchón, R., Widmer, I., Aragón, G., Escudero, A., Scheidegger, C. 2011. Remnants fragments preserve genetic diversity of the old forest lichen *Lobaria*

- pulmonaria* in a fragmented Mediterranean mountain forest. *Biodiversity and Conservation* 20: 1239 – 1254.
- Pauls, S. U., Nowak, C., Bálint, M., Pfenninger, M. 2013. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology* 22: 925 – 946.
- Peakall, R. O. D., Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288 – 295.
- Prieto, M., Romera, L., Merinero, S., Aragon, G., Martínez, I. 2015. Development and characterization of fungal specific microsatellite markers in the lichen *Lobarina scrobiculata* (Lobariaceae, Ascomycota). *The Lichenologist* 47: 183 – 186.
- Printzen, C., Ekman, S., Tønsberg, T. 2003. Phylogeography of *Cavernularia hultenii*: evidence of slow genetic drift in a widely disjunct lichen. *Molecular Ecology* 12: 1473 – 1486.
- Rafat, A. 2014. Ecological and biological studies of New Zealand lichens in the genus *Usnea*. PhD thesis, Lincoln University.
- Randlane, T., Jüriado, I., Suija, A., Lõhmus, P., Leppik, E. 2008. Lichens in the new Red List of Estonia. *Folia Cryptogamica Estonica* 44: 113 – 120.
- Randlane, T., Saag, A. (eds.) 1999. *Second checklist of lichenized, lichenicolous and allied fungi of Estonia*. *Folia Cryptogamica Estonica* 35: 1–132.
- Randlane, T., Saag, A. (koostajad). 2004. Eesti pisisamblikud. Tartu, Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Randlane, T., Saag, A., Martin, L., M., Timdal, E., Nimis, P. L. 2011. Eesti puudel kasvavad suursamblikud. Tartu, Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Randlane, T., Tõrra, T., Saag, A., Saag, L. 2009. Key to European *Usnea* species. *Bibliotheca Lichenologica* 100: 419 – 462.
- Saag, L., Tõrra, T., Saag, A., Del-Prado, R., Randlane, T. 2011. Phylogenetic relations of European shrubby taxa of the genus *Usnea*. *The Lichenologist* 43: 427 – 444.
- Scheidegger, C., Bilovitz, P. O., Werth, S., Widmer, I., Mayrhofer, H. 2012. Hitchhiking with forests: population genetics of the epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* in primeval and managed forests in southeastern Europe. *Ecology and Evolution* 2: 2223 – 2240.
- Scheidegger, C., Werth, S. 2009. Conservation strategies for lichens: insights from population biology. *Fungal Biology Reviews* 23: 55 – 66.

- Seymour, F. A., Crittenden, P. D., Dickinson, M. J., Paoletti, M., Montiel, D., Cho, L., Dyer, P. S. 2005. Breeding systems in the lichen-forming fungal genus *Cladonia*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 554 – 563.
- Shannon, C. E., Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. Illinois, University of Illinois Press.
- Singh, G., Gerande, F., Werth, S., Scheidegger, C. 2015. Long-term consequences of disturbances on reproductive strategies of the rare epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria*: clonality a gift and a curse. *FEMS microbiology ecology* 91: 1 – 11.
- Stocker-Wörgötter, E., Elix, J. A., Grube, M. 2004. Secondary chemistry of lichen-forming fungi: chemosyndromic variation and DNA-analyses of cultures and chemotypes in the *Ramalina farinacea* complex. *The Bryologist* 107: 152 – 162.
- Stothard, P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28: 1102 – 1104.
- Sullivan, T. J., Stanley H. F. 2004. Gene flow in the endophyte *Neotyphodium* and implications for coevolution with *Festuca arizonica*. *Molecular Ecology* 13: 649 – 656.
- Tõrra, T., Cornejo, C., Cheenacharoen, S., Dal Grande, F., Marmor, L., Scheidegger, C. 2014. Characterization of fungus-specific microsatellite markers in the lichen fungus *Usnea subfloridana* (Parmeliaceae). *Applications in plant sciences*, 2: 1 – 3.
- Tõrra, T., Randlane, T. 2007. The lichen genus *Usnea* (lichenized *Ascomycetes*, *Parmeliaceae*) in Estonia with a key to the species in the Baltic countries. *The Lichenologist* 39: 415 – 438.
- Truong, C., Divakar, P. K., Yahr, R., Crespo, A., Clerc, P. 2013. Testing the use of ITS rDNA and protein-coding genes in the generic and species delimitation of the lichen genus *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68: 357 – 372.
- Öckinger, E., Niklasson, M., Nilsson, S. G. 2005. Is local distribution of the epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* limited by dispersal capacity or habitat quality? *Biodiversity & Conservation* 14: 759 – 773.
- Walser, J. C., Sperisen, C., Soliva, M., Scheidegger, C. 2003. Fungus-specific microsatellite primers of lichens: application for the assessment of genetic variation on different spatial scales in *Lobaria pulmonaria*. *Fungal Genetics and Biology* 40: 72 – 82.

- Werth, S. 2010. Population genetics of lichen-forming fungi—a review. *The Lichenologist* 42: 499 – 519.
- Werth, S. 2011. Optimal sample sizes and allelic diversity in studies of the genetic variability of mycobiont and photobiont populations. *The Lichenologist* 43: 73 – 81.
- Werth, S., Cornejo, C., Scheidegger, C. 2013. Characterization of microsatellite loci in the lichen fungus *Lobaria pulmonaria* (Lobariaceae). *Applications in plant sciences* 1: 1 – 3.
- Werth, S., Wagner, H. H., Holderegger, R., Kalwij, J. M., Scheidegger, C. 2006. Effect of disturbances on the genetic diversity of an old-forest associated lichen. *Molecular Ecology* 15: 911 – 921.
- White, F. J., Peter W. J. 1985. A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances. London, British Lichen Society.
- Widmer, I., Grande, F., Excoffier, L., Holderegger, R., Keller, C., Mikryukov, V. S., Scheidegger, C. 2012. European phylogeography of the epiphytic lichen fungus *Lobaria pulmonaria* and its green algal symbiont. *Molecular Ecology* 21: 5827 – 5844.
- Wornik, S., Grube, M. 2010. Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. *Microbial Ecology* 59: 150 – 157.

### Internetiallikad

- eElurikkus: [<http://elurikkus.ut.ee/>] 05.03.2016
- Rambaut, A., Bogaardt, C., Dudas, G., Fagundes de Carvalho, L., Hall, M., Wikramaratna, P., Bedford, T., Bollback, J., Hedge, J., Lycett, S., Raghwani, J., Welch, J., 2015. Figtree: [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>] 09.05.2016
- GenBank: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>] 07.03.2016
- Metsaregister: [<http://register.metsad.ee/avalik/>] 07.03.2013
- Reverse Complement programm: [[http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)] 07.03.2016
- Rstudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. 2015. RStudio. Inc., Boston, MA. [<http://www.rstudio.com/>]05.03.2016
- RTL 2004, 69, 1134: III kaitsekategooria samblikuliikide püsielupaikade kaitse alla võtmine ja kaitse-eeskiri. [<https://www.riigiteataja.ee/akt/104072014022?leiaKehtiv>] 05.03.2016

Randlane, T., Saag, A., Suija, A. Lichenized, lichenicolous and allied fungi of Estonia. Ver.  
December 31, 2015 – [<http://esamba.bo.bg.ut.ee/checklist/est/home.php>]

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Tiina Mandel

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

Vars-habesambliku (*Usnea subfloridana*) populatsioonide geneetiline mitmekesisus Eestis, mille juhendajad on Tiina Randlane ja Polina Degtjarenko

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

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

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

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

**Lissabonis, 10.05.2016**

## Lisa 1

Eestis registreeritud (*certain*) habesamblikud (Randlane *et al.* 2015), nende sagedus ja ohukategooria Eesti 2008. a punase nimestiku (eElurikkus; Randlane *et al.* 2008) järgi.

	<b>Teaduslik nimi</b>	<b>Nimi eesti keeles</b>	<b>Sagedus</b>	<b>Ohukategooria</b>
1	<i>Usnea barbata</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	Kare habesamblik	Sage	Ohu piiril (NT) LKIII
2	<i>Usnea chaetophora</i> Stirt	Hõre habesamblik	Haruldane	Ohustatud (EN)
3	<i>Usnea dasopoga</i> (Ach.) Nyl.	Pikk habesamblik	Väga sage	Ohuväline (LC)
4	<i>Usnea diplotypus</i> Vain.	Narmas-habesamblik	Üsna sage	Ohu piiril (NT)
5	<i>Usnea fulvoreaegens</i> (Räsänen) Räsänen	Värvuv habesamblik	Sage	Ohustatud (EN)
6	<i>Usnea glabrata</i> (Ach.) Vain	Sile habesamblik	Üsna sage*	Kriitiliselt ohustatud (CR)
7	<i>Usnea glabrescens</i> (Vain.) Vain.	Jäik habesamblik	Väga sage	Ohuväline (LC)
8	<i>Usnea hirta</i> (L.) F.H. Wigg.	Kahar habesamblik	Väga sage	Ohuväline (LC)
9	<i>Usnea lapponica</i> Vain.	Lapi habesamblik	Väga sage	Ohuväline (LC)
10	<i>Usnea subfloridana</i> Stirt.	Vars-habesamblik	Väga sage	Ohuväline (LC)
11	<i>Usnea substerilis</i> Motyka	Laik-habesamblik	Üsna haruldane	Ohustatud (EN)
12	<i>Usnea wasmuthii</i> Räsänen	Wasmuthi habesamblik	Üsna sage	Ohualdis (VU)

\*leitud viimati 1959. aastal

## Lisa 2

DNA eraldamise modifitseeritud protokoll valmistaja (MO BIO) protokoll järgi. Kasutatud lahused PD1, PD2, PD3, fenoolide eraldamise lahus (Phenolic Separation Solution) ja RNase pärinevad muutmata kujul DNA-eraldamise komplektist PowerPlant® Pro DNA Isolation Kit (MO BIO).

1. Proovile lisati 3 metallkuuli ning lisati 410 µl lahust PD1 ja 40 µl fenoolide eraldamise lahust. Fenoolide eraldamise lahus lammutab tuumahapete fenoolse vormi, mis omakorda muudab nende eraldamise lihtsamaks.
2. Lisati 50 µl lahust PD2
3. Lisati 3 µl RNase A lahust ja segati (*vortex*) 3 sekundit. See samm lahustab proovis olevad RNA molekulid.
4. Proove peenesti purustajaga sagedusel 30000 pööret minutis kolme minuti jooksul pärlilöögi (*bead beat homogenization*) meetodil. Juhul, kui proovid polnud seejärel peenestatud, korrati protseduuri.
5. Tuube tsentrifugiti 13400 pöörde juures 3 – 4 minutit, sellel etapil vajub purustatud samblikukoe mass (sade) tuubi põhja ning DNA-d sisaldav vedelfaas jääb selle kohale.
6. 400 µl DNA-d sisaldavat lahust tõsteti puhtasse kahe milliliitrisesse tuubi, seejärel tsenrifugiti sadet sisaldavat proovi ning eraldati sealt veel kuni 50 µl lahust.
7. Proovile lisati 250 µl lahust PD3. See samm eemaldab lahuses PCR-analüüsi inhibiitorid.
8. Proove tsentrifugiti 13400 pöörde juures 3 minutit, et sadestada proteiinid ja inhibiitorid. Seejärel inkubeeriti proove 4 kraadi juures 5 minutit.
9. 600 µl proovi tõsteti puhtasse tuubi vältides sademe sattumist proovi.
10. Lisati 600 µl lahust PD4 ja 600 µl lahust PD6 ning proovi segati (*vortex*) 5 sekundit. Lahus PD4 sisaldab sidumis-soola, mis soodustab DNA seondumist filtertuubi membraanile. Lahus PD6 on etanoolipõhine puhver, mis samuti soodustab DNA-seondumist.
11. 600 µl lahust tõsteti filtertuubi ning tsentrifugiti seda 10 000 pöörde juures 30 sekundit. Selle sammu käigus seondub proovis olev DNA filtertuubi membraanile.



Tsentrifugmise tulemusel tuubi põhja kogunenud vedelik eemaldati proovist. Sammu korrati kolm korda.

12. Filtertuubi lisati 500 µl lahust PD5, see lahus eemaldab membraanilt üleliigse soola.

Proovi tsentrifuugiti 12200 pöördel 30 sekundit ning eemaldati tuubi põhja kogunenud lahus.

13. Filtertuubi lisati 500 µl lahust PD6, see samm eemaldab membraanilt viimased soola

jäägid. Proovi tsentrifuugiti 12200 pöördel 30 sekundit ning eemaldati tuubi põhja kogunenud lahus.

14. Proovi tsentrifuugiti 16000 pöördel 2 minutit, et eemaldada proovist lahus PD6.

15. Filtertuubi filter asetati ettevaatlikult puhtasse 2 milliliitrisesse tuubi.

16. Membraani keskele lisati 80 µl lahust PD7 ning inkubeeriti toatemperatuuril 2 minutit.

See lahus eemaldab DNA filtri membraanilt. Proovi tsentrifuugiti 12200 pöördel 30 sekundit ning tuubi põhja kogunenud lahusega korrati protseduuri

17. Tuubist eemaldati filter ning eraldatud DNA lahus hoiustati sügavkülmas (-20°C).

### Lisa 3

Agarosoogeeli valmistamise Bimboim ja Doly (1979) modifitseeritud protokoll järgi

1. Segada 1 g agarosipulbrit 100 milliliitri TBE puhvriga.
2. Kuumutada segu mikrolaineahjus 1 minut ja 20 sekundi vältel, loksutada segu hoolikalt ning kuumutati veel 25 sekundit.
3. Lisada 1,2 µg etiidiumbromiidi. See samm võimaldab hiljem DNA-d UV valguses visualiseerida.
4. Lasta geelil 20 – 25 minutit vormis tahkuda.

Lahus: 10 x TBE puhver: 108 g Tris, 55 g boorhapet, 9,3 g etüleendiamiintetra-äädikhapet (EDTA), 1 liiter destilleeritud vett