

Tartu Ülikool
Loodus- ja Tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste instituut
Botaanika osakond

Laura Valgma

**Reliktse hariliku kobarpea *Ligularia sibirica* (L.) Cass.
geneetiline mitmekesisus Eestis**

Magistritöö

Juhendaja: Ph. D. Tatjana Oja

Tartu 2015

Sisukord

1. Sissejuhatus	4
2. Perekonna <i>Ligularia</i> Cass. iseloomustus	5
2.1 Kobarpea iseloomustus	5
2.2 Kobarpea ökoloogia	7
2.3 Kobarpea levik Eestis ja mujal Euroopas	8
2.3.1 Kobarpea levik Eestis	8
2.3.2 Kobarpea levik Euroopas	10
3. Kaitse ja ohustatus Eestis ja mujal Euroopas	11
4. Eelnevalt Eestis tehtud uuringud	12
4.1 Ökoloogilistel teguritel põhinev uuring	12
4.2 Amplifitseeritud fragmentide pikkuse polümorfismil põhinev uuring	13
4.3 Populatsioonide taastamiskatsed	14
5. Geneetilise mitmekesisuse tähtsus taimepopulatsioonides	14
6. Töö eesmärgid ja hüpoteesid	16
7. Materjal ja meetodika	16
7.1 Välitööde meetodika	16
7.2 DNA eraldamine	18
7.3 Mikrosatelliitide analüüs	19
7.4 Praimerite optimeerimine ja PCR	20
7.5 Fragmentanalüüs	22
7. 6 Andmete analüüs	22
8. Tulemused	23
8.1 Mikrosatelliitide varieeruvus ning geneetiline mitmekesisus	23
8.2 Geneetiline ja geograafiline kaugus	24
8.3 Hierarhiline AMOVA analüüs	26
8.3 Peakomponentanalüüs	26
9. Arutelu	27
9.1 Populatsioonide geneetiline mitmekesisus	27
9.2 Populatsioonide eristumine	28
9.3 Geneetiline ja geograafiline kaugus	29
9.4 Liigikaitse	30
Kokkuvõte	31
Summary	32

Tänuavaldused.....	33
Kasutatud kirjandus	34
Kasutatud veebiaadressid	38
Lisad	39
LISA 1.....	39

1. Sissejuhatus

Harilik kobarpea (*Ligularia sibirica* (L.) Cass.), edaspidi kobarpea, on korvõieliste sugukonda kuuluv mitmeaastane õistaim. Eestis kuulub ta aastast 1936. looduskaitse alla ning alates aastast 1994. Kaitstavate Loodusobjektide Seaduse järgi kaitstavate taimeliikide I kategooriasse. Kobarpea on haruldane ka mujal Euroopas ning kuulub Euroopa Liidu loodusdirektiivi kaitstavate liikide hulka (Sammul, 2001; Eesti Entsüklopeedia, 2011).

Kobarpea kasvab tavaliselt lamminiitudel, rohketoitelistes madalsoodes, soostuvatel niitudel või allikasoodes. Neid elukohti ohustavad peamiselt inimõjud, milleks võivad olla jäätmete ladestamine, niitude ja karjamaade võsastumine (niitmise või karjatamise lõpetamine), korjamine või kogumine ja ehitustegevus (eElurikkus).

Kobarpead vaadeldakse kui reliktsset liiki, sest arvatakse, et ta levis siinsetele aladele pärast jääaja lõppu boreaalses kliimaperioodis. Hetkel leidub kobarpead 12 riigis ning säilinud populatsioonid kujutavad endast jäänuseid, mis on veel alles jäänud endisest suuremast levialast (Hendrych, 2003; Šmídová *et al*, 2011). Hetkel on hariliku kobarpea arvukus vähenemas ja selle põhjuste leidmiseks on viimastel aastatel läbi viidud mitmeid uuringuid (Kukk, 2003; Šmídová *et al*, 2011; Heinken-Šmídová & Münzebergová, 2012; Ilves *et al*, 2013; Lanno *et al*, 2013; Mänzu *et al*, 2013; Matei, 2014). Populatsioonide suurus on korrelatsioonis elupaikade kvaliteediga ning geneetilise mitmekesisusega. Vähenenud populatsioonis väheneb geneetiline mitmekesisus, millest omakorda väheneb kohasus. Selles tulemusel toodavad taimed vähem seemneid, väheneb seemnete idanevus ning suureneb idandite suremus (Leimu *et al*, 2006).

Geneetilist mitmekesisust saab uurida mitmete DNA-põhiste markeritega, näiteks AFLP, RFLP, RAPD, SNPs või SSR ehk mikrosatelliidid (Kalia *et al*, 2011). Alates mikrosatelliitide kasutusele võtmisest 1980. aastate lõpust, on nende populaarsus tõusnud kordades ning iga aasta ilmub tuhandeid töid, mis põhinevad mikrosatelliitidel (Guichoux *et al*, 2011). Uuringuks ei lähe vaja sadu indiviide, piisab juba 25-30 isendi analüüsimisest ning saab hea ülevaate populatsiooni alleelisagedustest (Hale *et al*, 2012). Käesolevas töös on samuti otsustatud mikrosatelliitide kasuks ning kasutatakse varem valmis tehtud praimereid (Mao *et al*, 2009).

2. Perekonna *Ligularia* Cass. iseloomustus

Perekond *Ligularia* Cass. kuulub õistaimede (*Anthophyta*) hõimkonda, päriskaheiduleheliste (*Eudicotyledonae*) klassi, astrilaadsete (*Asterales*) seltsi ja korvõieliste sugukonda (*Asteraceae*) (eElurikkus). Perekonna kobarpea esindajad on mitmeaastased püsikud (Eichwald *et al*, 1978) ning hetkel kuulub sinna perekonda 129 liiki, mis on omakorda jaotatud kuude erinevasse sektsiooni (Liu *et al*, 1994). Enamus perekonna mitmekesisusest on koondunud Tiibeti platoo piirkonda, kus võib leida enam kui sada kobarpea esindajat, millest omakorda 60 on endeemsed sellele piirkonnale (Liu, 2004). Praeguse arvamuse järgi ei ole perekonna kobarpea mitmekesisustumine lõppenud ning selle peamises leviku piirkonnas mõjuvad evolutsioonilised jõud (Liu *et al*, 2006) ning iga aasta leitakse aladelt, kus kattuvad vähemalt kahe kobarpea levila, vahepealsete tunnustega hübriide (Pan, *et al*, 2008; Yu *et al*, 2014).

Euroopas on kaks perekonna kobarpea esindajat: *Ligularia glauca*, mille leiukohti on avastatud Rumeeniast, ning harilik kobarpea (*Ligularia sibirica*) (Eichwald *et al*, 1978; Sammul, 2001).

2.1 Kobarpea iseloomustus

Harilik kobarpea on mitmeaastane õistaim, mis võib elada üle kümne aasta (Sammul, 2001), ekstreemsematel juhtudel isegi kuuskümmend aastat (Heinken-Šmídová & Münzebergová, 2012). Taime ladinakeelne nimi on tuletatud sõnadest *ligula* (ld k keeleke, mis tuleb äärisõite kuju järgi) või verbist *ligale* (ld k köitma) ning *sibirica* (ld k siberi või Siberist pärinev) (Eichwald *et al*, 1978).

Taim võib kasvada 30–160 cm kõrguseks (Eichwald *et al*, 1978; Sammul, 2001; Šmídová *et al*, 2011), mõned individid on kasvanud Eestis ka üle 200 cm (Kukk, 2003). Taime varred on punakasvioletja alaosaga ning võivad olla õisiku alusel karvased. Lehed, mis on kuni 25 cm pikad ja kuni 20 cm laiad, on paljad või alumisel pinnal roodude kohal ja servadel karvased. Juurmised lehed on pikarootsulised, neerjad kuni kolmnurkjad südaja alusega ning nende serv võib olla terve või sakiline. Varrelehed on kolmnurkjad, lühema rootsuga ning laienenud kileja tupega (Eichwald *et al*, 1978).



Joonis 1. Vasakul: harilik kobarpea õitsemas. Kobarpea kasvab keskmiselt 1 m kõrguseks ning sellel on iseloomulikud kollased korvõisikud, mis on tavaliselt putuktolmeldatavad. Paremal: pärast õitsemist moodustuvad pappusega varustatud seemnised. Pilt: M. Nobis.

Korvõisikud on 2,5–3,5 cm läbimõõduga ning on paljuõielised. Õisikud on lihtkobarjas liitõisikus, mis koosnevad tavaliselt 10–30 korvõisikust, harvemal juhul 35 korvõisikust. Üldkatis, mille lehed on piklikud, tõmbilt teritunud ning lillaka värvusega, on ruljas või kellukjas. Õisikupõhi on lame ja paljas. Äärisõisi on tavaliselt 8–11, aga võib olla ka rohkem või vähem. Äärisõied on kollased, 1,5 cm pikad ja äraspidimunaja keeleosaga. Putkõied on kollased viietipmelise kitsa putkega ning on mõlemasugulised, neid on tavaliselt 20–30 (Eichwald *et al*, 1978). Seemnised, mis on 5–6 mm pikad ning kaaluvad keskmiselt 2,16 mg (Šmídová *et al*, 2011), on ruljad ning on pruunikasvalkja lihtkarvadest pappusega (Eichwald *et al*, 1978).

Pappusega varustatud seemnistest maandub osa otse emataime vahetusse lähedusse. Seemnised idanevad samal aastal või järgmise aasta kevadel. Esimesed ilmuvad lehed on

neerukujulised ning tervete servadega. Teise aasta taimedel on tekkinud leherosett, kus on 2-3 lehte, kolmanda aasta taimedel on rosetis juba neli lehte. Neljandal või viiendal aastal võib taim esimest korda õitseda. Taimed õitsevad igal aastal ning juhul, kui nad ei õitse, näitab see taime elujõu vähenemist (Kobiv, 2005).

Taim õitseb keskmiselt kaks nädalat (Kobiv, 2005) juuli keskpaigast augusti keskpaigani (Kukk, 2003). Seemned saavad valmis augusti lõpuks või septembri alguseks ning levivad tavaliselt tuulega (Kukk, 2003). Kuna kuivanud õied jäävad varre külge, vabanevad sealt seemned nende valmimisest kuni lume tulekuni (Kobiv, 2005). Lisaks tuullevile levivad seemned harvemal juhul loomadega. Peale seemniste saab liik levida veel vegetatiivselt kas risoomitükikestega või uute rametite moodustamisega õitseva taime risoomi külge (Kukk, 2003).

Oma paljunemissüsteemi poolest on kobarpea segatolmleja, mis tähendab seda, et ta on nii võõrtolmleja kui ka isetolmleja (Šmídová *et al*, 2010). Strateegia oleneb sellest, kui palju on populatsioonis isendeid, kui kaugemale levivad tolmeldajad ja kui suur on populatsioonide vaheline kaugus (Šmídová *et al*, 2010; Ilves *et al*, 2013).

2.2 Kobarpea ökoloogia

Liigi kasvukoha määravad peamiselt niiskus- ja valgustingimused. Kobarpea eelistab kasvada eelkõige päikese käes või poolvarjus. Juhul, kui taim kasvab varjus, väheneb suguline paljunemine ning seemniste toodang (Kukk, 2003; Šmídová *et al*, 2011). Peale selle kasvavad päikese käes ja poolvarjus peamiselt noored ning õitsevad taimed ning varjus vegetatiivsed taimed, mis levivad peamiselt risoomide abil, mis ei ole väga efektiivne (Kukk, 2003).

Kobarpea kasvab soostunud ja madalsooniitudel, puisniitudel, jõelammidel ja niiskeis võsastikes liikuva põhjaveega aladel (Eichwald *et al*, 1978). Liiki võib leida eelkõige mesotroofsetelt või oligotroofsetelt pigem happelistel muldadel, aga kobarpead on leitud ka lubjarikastelt ning toitaineterikkalt pinnaselt (Neblea, 2009).

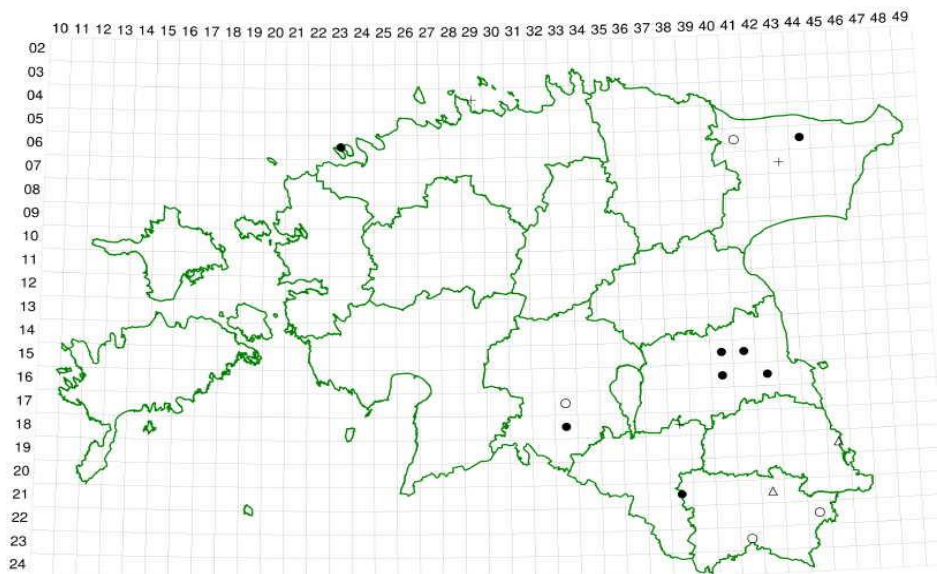
2.3 Kobarpea levik Eestis ja mujal Euroopas

Kobarpea on boreaalne liik, mille peamine levila on Venemaa Leningradi oblastist Kesk-Siberini. Peale selle leidub liiki veel hajusate populatsioonidena Kesk- ja Põhja-Euroopas (Kobiv, 2005).

Kobarpea levis Siberist Euroopa suunas pärast jääaja lõppu (10 000 – 7 000 a eKr), kui Euroopa selleaegne kliima meenutas praegust kliimat kobarpea põhilevialal Venemaal (Šmídová *et al*, 2011). Selle tõestuseks räägib üks uurimus, mis viidi läbi Rumeenias, kus tehti kindlaks, et kobarpea on sealsetele aladele jõudnud pärast jääaega (u 7 000 a eKr), kui kliima oli muutunud soojemaks (Neblea, 2009).

2.3.1 Kobarpea levik Eestis

Kobarpea on levinud Eestis peamiselt kahes piirkonnas: Kirde-Eestis, Tartus ning sellega piirnevatel aladel (Sammul, 2001). 1969. aastal oli Eestis 18 populatsiooni, millest praeguseks on alles jäänud 9 elujõulisemat ning seal olevate taimede arv on vähenenud aastast aastalt (Kukk, 2003). 2011. aastal on keskkonnaregistri järgi 32 kobarpea leiukohta (sh üksikleid) (Eesti Entsüklopeedia, 2011).



Joonis 2. Hariliku kobarpea (*Ligularia sibirica*) leiukohad Eestis. Must täpp tähistab leidu aastatel 1971-2005 ning seest valge täpp aastatest 1921-1970 (Kukk & Kull, 2005).

Suuremad populatsioonid on: Pressi, Väägvere, Õisu, Sootaga, Tagula, Ädise ja Kikaste. Tänapäevaks alles jäänud isendid on jaotunud populatsioonide vahel ebaühtlaselt, millest kõige suuremad on Väägvere, Sootaga ja Tagula, mis hõlmavad ligi 90% kõikidest isenditest (Kukk, 2003; Ilves *et al*, 2013).

2.3.1.1 Tartu ning Tartu ümbrus

Läbi aastate on Tartu ja selle ümbruskond olnud kõige kindlamaks kobarpea leiupaigaks ja siit pärinevad esimesed leiud juba 19. sajandi alguspoolest (Germann, 1807; Sammul, 2001). Suuremad populatsioonid on Vasulas, Väägveres ning Sootagas. Populatsioonid on seotud Amme jõega ning Emajõe jõega, mille luhtadelt on tihti leitud mitmeid populatsioone (Sammul, 2001). Arvatavasti seemned kandusid vooluga edasi ning sedasi sai liik endale uusi kasvukohti.

Kõige rohkem ohustab sealseid populatsioone maaparandamine, Tartu linna suurenemine ning sobilike alade kiire võsastumine ja metsastumine. Aladel, mida enam ei majandata, hakkab kasvama pilliroog, angervaks, mätastarn või kõrvenõges ning need tõrjuvad kobarpea välja (Sammul, 2001).

Tartust lõunapool olevatel aladel on leitud palju üksikuid leiukohti, aga aastate jooksul on tekkinud mõni püsivam populatsioon (Tagula, Luutsniku, Õisu). Sealsed vanimad leiud pärinevad Õisust 19. sajandi keskpaigast (Sammul, 2001).

Populatsioone ei ohusta kindlalt vaid üks ohutegur, kas siis maaparandamine või võsastumine, vaid see, et tegu on üksikleidudega ning neid ei pruugi enam üles leida. Ehk siis taimede levimine sinna on juhuslik sisseränne ja ei ole kasvanud püsivaks populatsiooniks (Sammul, 2001).

2.3.1.2 Kirde-Eesti piirkond

Kirde-Eesti populatsioonid on olnud sarnaselt Tartu piirkonnale tugevad ja püsivad. Vanimad leiud pärinevad 1930. -ndatest aastatest Liignurmest ning Mäetaguselt. Hetkel on populatsioon säilinud Kukrusel (Sammul, 2001). Üks suuremaid populatsioone oli seal Jõhvi

linna läheduses, mis praeguseks on hävinud. Arvatavasti sai sellele saatuslikuks linna suurenemine, alade mitterajandamine ning sinna lähedusse prügi ning muu prahi vedamine.

Sealseid populatsioone ohustab peamiselt maaparandus, võsastumine ning põlevkivi kaevandamine (Sammul, 2001).

2.3.2 Kobarpea levik Euroopas

Kobarpea praegune leviala jääb peamiselt Ida-Euroopasse ja Lääne- ja Kesk-Aasiasse. Hetkel allesjäänud populatsioonid kujutavad endast kobarpea maksimumlevila jäänuseid ning asuvad teineteisest geograafiliselt eemal (Henrdych, 2003; Šmídová *et al*, 2011).



Joonis 3. Kobarpea leiukohad. Peamise levila moodustab Venemaal Leningradi oblast ning Karjala piirkond. Peale selle leidub kobarpead hajusalt Eestis, Lätis, Ungaris, Poolas, Valgevenes, Tšehhis, Slovakkias, Rumeenias, Horvaatias, Prantsusmaal ning Austrias (Šmídová *et al*, 2011). Kaart: Portal ISOP.

Leviku põhiosa moodustavad Venemaa Leningradi oblastis ning Karjalas olevad populatsioonid (Eichwald *et al*, 1978). Mujal Euroopas on kobarpead leitud Ukrainast, Valgevenest, Lätist, Poolast, Bulgaariast, Rumeeniast, Ungarist, Tšehhist, Slovakkias, Horvaatiast, Prantsusmaalt ning Austriast (joonis 3) (Šmídová *et al*, 2011).

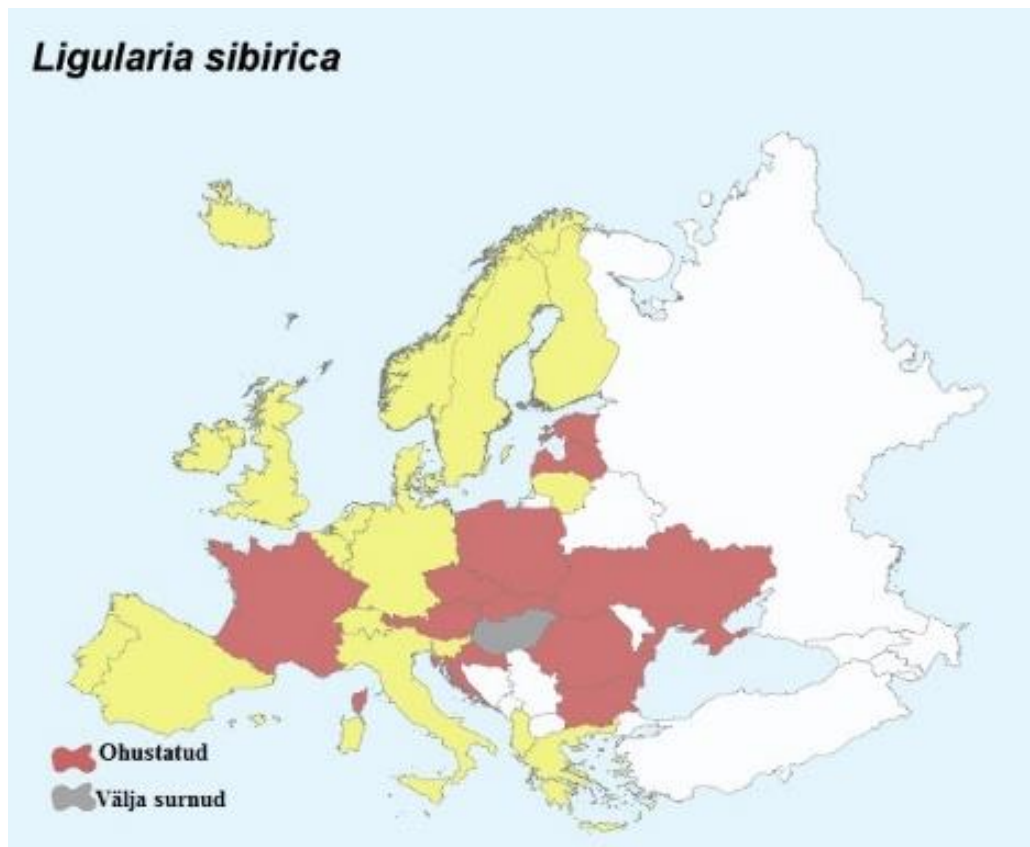
3. Kaitse ja ohustatus Eestis ja mujal Euroopas

Kobarpea on Eestis alates 1936. aastast looduskaitse all. Ühes sellega reguleeriti, et liiki ei tohi korjata, lõigata, raiuda, hävitada või meelega kahjustada (RT 1936, 49, 408). Praegu kuulub kobarpea I looduskaitsekategooria kaitstavate liikide hulka ning selle kaitsmiseks on vastu võetud kaitse-eeskiri, mille kohaselt on kaitse alla võetud kuus kasvukohta (Edise, Jõhvi, Sootaga, Kikaste, Väägvere ja Tagula) (RT 2006, 13, 210). Kaitse-eeskirjaga saab täpsemalt tutvuda Lisas 1.

Peale selle on kobarpea kantud Punasesse Nimestikku, kus ta staatuseks on hetkel ohualdis. Suuremateks ohuteguriteks on märgitud jäätmete ladestamine, kasvuks sobilike kohtade võsastumine, korjamine ja kogumine, ehitustegevus, soode kuivatamine ning turba võtmine. Kaitsesoovituseks on välja pakutud ohutegurite likvideerimine (Eesti Punane Raamat, 2008).

Ühtlasi on kobarpea kantud Euroopa Loodusdirektiivi II ja IV lisasse, mille kohaselt tuleb liigi kaitseks luua kaitsealasid, ja Berni konventsiooni I lisasse, mille kohaselt tuleb liigi kaitseks koostada vajalikke seaduseid ning rakendada neid (Sammul, 2001; Eesti Entsüklopeedia, 2011).

Kobarpea populatsioonid on Euroopas viimastel aastakümnetel kahanenud (joonis 4). Liigi halvast olukorrast saab aimu ka ohustatuse staatusest riikides: Bulgaarias, Horvaatias, ja Poolas on liik kriitiliselt ohustatud (CR); Lätis ja Austrias eriti ohustatud (EN); Eestis, Prantsusmaal, ja Slovakkias ohualtid (VU) ning Ungaris arvatavasti välja surnud (EX) (Portal ISOP).



Joonis 4. Kobarpea olek Euroopas. Liik on välja surnud Ungaris, ohustatud Eestis, Lätis, Poolas, Prantsusmaal, Valgevenes, Slovakkias, Bulgaarias Horvaatias (Portal ISOP).

4. Eelnevalt Eestis tehtud uuringud

4.1 Ökoloogilistel teguritel põhinev uuring

Ühes Eestis läbi viidud uuringus võrreldi kobarpea endist ja praegust levikut ning elupaiga kirjeldust ja analüüsiti populatsioonide dünaamikat ning peamiseid põhjuseid, miks on toimunud muutused populatsioonide arvukuses. Uuringus kasutati kaheksat populatsiooni: Anne, Väägvere, Sootaga, Tagula, Edise, Jõhvi, Kikaste ja Õisu. Neist kaheksast populatsioonist neljal esimesel olid 10x10 m suurused katseruudud, mida mõõdeti aastatel 1994–2002, ülejäänud populatsioone uuriti ilma katseruududeta. Katseruududel mõõdeti järgnevaid parameetreid: taimkatte tüüp, põõsaste ja rohundite kattuvus (protsentides), viiepunktiskaalal sagedamini esinevaid taimi, kasvutingimusi ning inimõjude allikaid (Kukk, 2003).

Uuringus leiti, et Anne populatsioon kahanes u 100-lt isendilt 20-le, Väägveres 130-lt 63-le ja Sootagas 86-lt 60-le. Ainus populatsioon, mis suurenes, oli Tagula, vastavalt 169-lt 356-le. Samuti mõõdeti isendite pikkust, mis on heaks elujõulisust näitavaks tunnuseks. Ühel aastal oli Anne populatsioonis isendite pikkus üle 200 cm, aga järgnevatel aastatel nii pikki isendeid ei leitud. Väägveres olid isendid keskmiselt 75-85 cm pikad ning Sootagas 50-125 cm. Tulemused näitasid, mida enam muutusid tingimused, seda rohkem muutusid ka populatsioonid ehk siis, kui võsa ning mets hakkas peale kasvama, halvenesid valgustingimused ning vähenes taimede kasv ning elujõulisus (Kukk, 2003).

4.2 Amplifitseeritud fragmentide pikkuse polümorfismil põhinev uuring

Teises uuringus, milles kasutati AFLP (*amplified fragment length polymorphism* – amplifitseeritud fragmentide pikkuse polümorfism) markereid, uuriti Eestis kasvavate populatsioonide geneetilist mitmekesisust ning seost populatsiooni suuruse ning geneetilise mitmekesisuse vahel. Uuringus kasutati seitset suuremat populatsiooni: Anne, Jõhvi, Õisu, Sootaga, Tagula, Pressi ja Väägvere (Ilves *et al*, 2013).

Analüüsi tulemusena leiti, et kõige suurem geneetiline mitmekesisus ning polümorfsete lookuste arv oli Tagula ning kõige väiksem Anne populatsioonis. Geneetiline mitmekesisus oli seotud populatsiooni suurusega: Tagula populatsiooni suuruseks hinnati 1 500 isendit ja Anne populatsioonis oli 7 isendit. Tulemusi iseloomustati, kasutades peakomponentanalüüsi (PCA) ja selle põhjal moodustasid peaaegu kõikide populatsioonide isendid omaette rühmad. PCA näitas samuti, et isendite geneetiline kaugus ja geograafiline kaugus ei olnud omavahel korrelatsioonis. Seemnete analüüsil, mida korjati kahel aastal (2007 ja 2008), leiti olulised erinevused aastate ja populatsioonide vahel. Seemnete idanevus oli positiivses korrelatsioonis polümorfsete lookuste arvuga ja populatsiooni suurusega (Ilves *et al*, 2013).

Samuti leiti, et uuritud seitsmes populatsioonis esineb isetolmlemist või lähedases suguluses olevate isendite vahelist tolmeldamist. Populatsioonid olid omavahel erinevad ning pakuti välja mitu teooriat. Esiteks populatsioonide vahel ei esine geenivoolu: õietolm ei levi ühest populatsioonist teise, sest tolmeldajad ei läbi nii pikki vahemaid, mis lahutavad kahte populatsiooni. Peale selle tolmeldajad külastavad tavaliselt naabertaimi. Siiski toodi välja, et seemneid võivad kaugemale levida, sest seemnistel on pappus, mille abiga nad saavad

levida tuulega, ning populatsioonid on jõgede ääres, mille vooluga saab seemnis edasi liikuda. Kuna ei leitud geograafilise kauguse ning geneetilise kauguse vahelist korrelatsiooni, pakuti välja, et õietolmu ning seemniste levikut takistavad looduslikud barjäärid nagu näiteks mets (Ilves *et al*, 2013). Samas on korduvalt tõestatud, et looduslikud barjäärid soodustavad populatsioonide isoleeritust ning vastavalt geneetilist eristumist (Leimu *et al*, 2006; Aguilar *et al*, 2008; Jacquemyn *et al*, 2012).

4.3 Populatsioonide taastamiskatsed

Lanno & Sammuli (2013) uuringus taheti teada saada naabertaimede mõju ulatust ning seoses sellega muutunud kasvutingimuste (eelkõige valguse) mõju isenditele, mis olid kasvatatud laboris ning hiljem viidud tagasi oma õigesse populatsiooni. Kasutati nelja kobarpea populatsiooni (Sootaga, Väägvere, Tagula ja Õisu), sest need toodavad piisavalt seemneid ning seal on nii avatumaid kui ka varjulisemaid kasvukohti. Seemnetest idandatud taimi kasvatati laboris senikaua, kuni neil oli arenenud kolm lehte ning seejärel viidi nad tagasi loodusesse, kus nad pandi kasvama samasse populatsiooni erinevatele katseruutudele (teised taimed on eemaldatud või mitte ning kasvukoht avatud või varjuline).

Tulemustes saadi teada, et kobarpeataime kasvu soodustab avatud kasvukoht. Autorite eelduste kohaselt oleks pidanud naabertaimedeta kasvanud taimed paremini hakkama saama, aga tulemused olid vastupidised: üksikult kasvanud isendid ei olnud edukamad. Oletati, et taimi võisid mõjutada sellisel juhul metsloomad, sest paljaks tehtud pind võis äratada nende tähelepanu (Lanno & Sammuli, 2013).

5. Geneetilise mitmekesisuse tähtsus taimepopulatsioonides

Geneetiline mitmekesisus on üks kolmest tunnustatud biodiversiteedi näitajast, mida tuleb säilitada. Geneetiline mitmekesisus on alleelide ja genotüüpide varieeruvus teatud organismide rühmas, populatsioonis või liigis. Üldiselt on näidatud, et geneetiliselt mitmekesisemad populatsioonid saavad paremini hakkama muutuvates keskkonna-

tingimustes ning mida varieeruvam on populatsioon, seda elujõulisem see on (Reed & Frankham, 2003). Geneetilist mitmekesisust mõjutavad eelkõige paljunemisviis, mutatsioonid ja alleelide sageduse muutused, mida põhjustab migratsioon, looduslik valik ja juhus (Frankham *et al*, 2005). Laialt levinud liigid ning võõrtolmlevad liigid on geneetiliselt mitmekesisemad kui haruldased või endeemsed liigid ning isetolmlevad liigid (Hamrick & Godt, 1996).

Populatsiooni suurus ning isoleeritus samuti mõjutavad geneetilist mitmekesisust. Populatsioonis, mille suurus on vähenenud, muutuvad juhusliku geenitriivi tõttu alleelide sagedused ning inbriidingu tõttu suureneb homosügootsete isendite osakaal. Inbriiding on geneetiliselt lähedaste isendite ristumine, ekstreemsematel juhtudel isegi iseviljastumine. Homosügootses olekus võivad kokku sattuda kahjulikud retsessiivsed alleelid, mis vähendavad taime kohasust ehk siis isend ja populatsioon tervikuna kannatavad inbriidingu depressioonis (Charlesworth, 2003; Charlesworth & Willis, 2009), mille tagajärjel omakorda väheneb seemnete toodang ning kvaliteet, suureneb idandite suremus ning väheneb nende kasv (Oostermeijer *et al*, 2003). Pikemal ajaperioodil võib geneetilise mitmekesisuse kadu viia populatsiooni väljasuremiseni (Ouborg *et al*, 2006).

Suurenenud isoleeritus takistab populatsioonide vahelist geenivoolu ning seetõttu tõuseb populatsioonide vaheline geneetiline erinevus (Jacquemyn *et al*, 2012). Peale selle fragmenteerumine vähendab populatsioonide sisest varieeruvust ning seda just juhusliku geentriivi tõttu (Leimu *et al*, 2006), aga selle mõju ja ulatus olenevad taime paljunemisviisist ning tolmeldajatest (Aguilar *et al*, 2008; Jacquemyn *et al*, 2012).

Geneetilist mitmekesisust saab mõõta erinevate DNA markeritega. Ideaalsed markerid on neutraalsed, ei ole loodusliku valiku all ja on piisavalt varieeruvad (Charlesworth, 2003). Markereid saab jagada laias laastus kahte rühma: dominantsed ja kodominantsed markerid. Dominantsed markerid on näiteks RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – juhuslikult amplifitseeritud polümorfne DNA), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats* – vaheline lihtne kordusjärjestus) ja AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – amplifitseeritavate fragmentide polümorfism).

Kodominantsed markerid on näiteks allosüümid ning mikrosatelliidid. Kodominantsetel markeritel on näha diploidse indiviidi mõlemaid alleele ning selle alusel saab eristada heterosügootseid organisme. Selle põhjal saab populatsioonis hinnata nii alleelisagedusi kui ka indiviidide geneetilist kaugust (Escudero *et al*, 2003).

6. Töö eesmärgid ja hüpoteesid

Töö eesmärgid:

1. Iseloomustada kobarpea populatsioonisisest ning populatsioonide vahelist geneetilist mitmekesisust kasutades kodominantseid SSR markereid.
2. Võrrelda uuritud populatsioonide geneetilist eristumist üksteisest.
3. Tuvastada, kas populatsiooni suurus ning geneetiline mitmekesisus on omavahel seotud.

Töö hüpoteesid:

1. Väiksemates populatsioonides on väiksem geneetiline mitmekesisus ning võib esineda inbriidingu depressioon.

7. Materjal ja meetodika

7.1 Välitööde meetodika

Kobarpea geneetilise mitmekesisuse uurimiseks valiti viis suuremat populatsiooni: Väägvere, Sootaga, Pressi, Tagula ja Õisu (joonis 5). Algselt olid uurimusse kaasatud Anne ja Jõhvi, aga 2014. aastaks olid need populatsioonid hävinud.

Proove korjati 2013. aasta juunis ja augustis. Mikrosatelliitanalüüsiks korjati igast populatsioonist kahekümnelt kuni kahekümne seitsmelt juhuslikult valitud isendilt 1x1 cm suurune lehetükike, mida säilitati silikageelis selle täieliku kuivamiseni. Kokku uuriti 118 isendit viiest erinevast populatsioonist (tabel 1).



Joonis 5. Kobarpea (*Sibirica ligularia*) uuritud viis populatsiooni: Öisu, Sootaga, Väägvere, Tagula ja Pressi.

Tabel 1. Hariliku kobarpea populatsioonid ning neid iseloomustavad andmed

Kohanimi	Asukoht	Uuritud isendite arv
Väägvere	Tartu maakond, Tartu vald	21
Sootaga	Tartu maakond, Tartu vald	25
Pressi	Võru maakond, Haanja vald	20
Tagula	Valga maakond, Tõlliste vald	27
Öisu	Viljandi maakond, Halliste vald	25

7.2 DNA eraldamine

Kuivanud lehtedest eraldati DNA vastavalt Soltis Lab CTAB DNA Exctraction protokoll järgi, mis on koostatud Doyle & Doyle (1987) ning Cullings (1992) andmete järgi ning on loodud DNA eraldamiseks nii kuivadest kui värsketest lehtedest.

DNA eraldamise protokoll (Doyle & Doyle, 1987; Cullings, 1992):

1. 0,6 g PVP-d (polüvinüülpürrolidoon) lahustati 15 ml CTAB-puhvrts ning sellele lisati 75 µl β-merkaptotetanooli (antud kogusest jätkub 24 proovile);
2. igast leheproovist kaaluti 10- 20 mg materjali steriilsetesse tuubidesse;
3. materjal purustati tuubis kasutades teravaid kääre. Pärast iga proovi purustamist käärid steriliseeriti piirituslambil ning lasti jahtuda;
4. purustatud materjalile lisati 500 µl eelnevalt valmistatud puhvrisegu (vt punkt 1) ning loksutati, et proovid ja puhver oleksid korralikult segunenud. Proovid asetati seejärel 55° C juurde vähemalt üheks tunniks;
5. proovidele lisati 500 µl kloroformi segu (24:1 kloroform ja isoamüülalkohol) ja raputati korralikult;
6. proovid tsentrifugeeriti 10 minutit maksimumkiirusel (13 000 rpm). Selle ajal jooksul kihistus proov kolmeks kihiks: peal on vesifaas, keskmine on leheproovi jäänused ning alumine kloroform;
7. proovidest eraldati vesifaas ning pandi uutesse tuubidesse;
8. lisati u 32 µl külma amooniumatsetaati (7,5 M) ning 230 µl külma isopropanooli. Lisatav kogus olemas vesifaasi kogusest;
9. proovid segati korralikult ning pandi ööseks sügavkülma;
10. proove tsentrifugeeriti 5 minutit maksimumkiirusel, pärast seda valati ettevaatlikult ära vedelik. Tuubi põhja jäi DNA sade;
11. lisati 700 µl külma 80% etanooli ning loksutati ettevaatlikult;
12. proove tsentrifugeeriti 3 minutit maksimumkiirusel;
13. proovidest eemaldati ettevaatlikult etanool;
14. lisati 700 µl külma 95% etanooli ning loksutati ettevaatlikult;
15. tsentrifugeeriti 3 minutit maksimumkiirusel
16. proovidest eemaldati ettevaatlikult etanool;
17. proovid asetati kuumakappi või termostaadile 37° C juurde üheks tunniks või senikaua, kuni need on kuivad;

18. proovidele lisati 100 µl TE puhvrit ning asetati üheks tunniks kuumakappi 55° C juurde;
19. kontrolliti geelelektroforeesil eraldatud DNA kvaliteeti;
20. proovide hoiustamine sügavkülmas.

Lahused

CTAB puhver (1 L):

100 ml 1 M Tris'i (pH 8); 280 ml 5 M NaCl; 40 ml 0,5 M EDTA; 20 g CTAB (tsetüültrimetüül-ammooniumbromiid)

TE puhver (1 L):

10 ml 1 M Tris'i (pH 8); 2 ml 0,5 M EDTA, seejärel lisada vett kuni liitritähiseni.

1 M Tris, pH 8 (1 L)

121,1 g Tris (2-amino-2-hüdroksümetüül-propaan-1,3-diool); 700 ml ddH₂O; ca 50 ml HCl (pH tõstmiseks tasemele 8)

0.5 M EDTA, pH 8 (1 L):

186,12 g EDTA (etüleendiamiintetra-äädikhape); 750 ml ddH₂O; ca 20 g NaOH (lisa NaOHd kuni pH on 8, EDTA ei lahustu enne kui pH on peaaegu 8)

5 M NaCl (1 L):

292,2 g NaCl; 700 ml ddH₂O

7.3 Mikrosatelliitide analüüs

Käesolevas töös otsustati kasutada mikrosatelliit järjestusi (SSR – *simple sequence repeats*), sest need on kõrge polümorfsusega ning kodominantsed ehk näitavad heterosügootide puhul mõlemaid allelele (Parida *et al*, 2006). Mikrosatelliitide kasutamisel markeritena peab olema eelinfo uuritava taime kohta, sest nendele on loodud spetsiifilised praimerid (Kalia *et al*, 2011). Kobarpea perekonnas on loodud spetsiifilised praimerid liigi *Ligularia hodgsonii* jaoks Mao *et al* (2009) poolt.

7.4 Praimerite optimeerimine ja PCR

Optimeerimiseks kasutati 16 praimerit (tabel 2), mis töötas välja Mao *et al* (2009). Kõigepealt leiti iga praimeri jaoks kõige sobivam temperatuur ning magneesiumi allikas. Selleks kasutati PCR-gradientprogrammi, mis proovib läbi erinevad seondumistemperatuurid madalatest kõrgete kraadideni (+48° C – +64,1° C). Paremaste tulemuste saamiseks varieeriti märklaud-DNA ja praimerite kogust. Visualiseerimiseks lisati praimeritele spetsiifilised fluorestseeruvad sabad (tabel 3).

Tabel 2. Optimeerimiseks valitud praimerid (Mao *et al*, 2009).

Nimi	Nukleotiidne järjestus	Saba	Kordusmotiiv	Pikkus (bp)	Seondumis- temperatuur
Lho12	F: CTCCTTTCTACTCCTCTATG R: CAAGAATACGAAGATTTACC	M13	(GT) ₂ TC(GT) ₆	276–295	54
Lho17	F: TTGCCTCAAAGGTCTCTT R: CCCTAACACCACTCAATG	M13	(GT) ₅	132–142	54
Lho29	F: TCCACTCACTAAGGGGAACA R: ACGGATCGTTAGGGTTCA	M13	(TC) ₅ ...(AC) ₇	143–153	58
Lho35	F: AACCATCGCTGCACATTC R: GCAACACCACCACTGACG	M13	(TC) ₉	170–210	57
Lho36	F: ACCTTCGAATTATTCTTTTCGC R: TCTCAGAGCTTTTCAGTGTCTAT	CAGT	(CT) ₅ ...(AC) ₅ ... (AC) ₅	229–250	57
Lho38	F: CTTACACCTCCGAAGTATC R: TCTAAAAGGGAAATGGAAACA	M13	(AC) ₅ ...(AC) ₄ ... (AC) ₇	272–290	57
Lho40	F: ATCATACCTTGCCTCAAAGT R: CAATAGTTCCGAACACCCT	M13	(CT) ₆ ...(TG) ₄	192–202	57
Lho41	F: ACGAGTAGACACCCAACGTC R: CCTTTCTTCCCAACACAA	M13	(AG) ₄ AT(AG) ₈ ... (AG) ₉	180–205	57
Lho64	F: CGAATGACATGAACACCAC R: CCTTCCTCCTTGAGCCTAT	CAGT	(ATG) ₆ ... (AG)rich	160–195	57
Lho75	F: CCACCATCATTTTCTGTAG R: GTATGAGACACCACCGAAT	M13	(CT) ₁₈	185–220	54
Lho77	F: AGTTTTGTAGTAAAACGGAGTT R: CGCATAAATAATGTAAGCA	M13	(TG) ₇	178–198	55
Lho114	F: AGTTCGGTTTGCTGCTAT R: TGGGCTTATGGACTTGAT	CAGT	(GA) ₆	220–235	55
Lho154	F: CACCTTCTCCTCCTACACG R: CCTAGATCTTCATCTCTTTTCT	CAGT	(GT) ₆ ...(GT) ₇ T(GT) ₆	175–195	58

Tabel 3. Kasutatud praimerite märgistused

Nimi	Järjestus
M13	AGGAAACAGCTATGACCAT
CAGT	ACAGTCGGGCGTCATCA

Kuna eelpool nimetatud praimerid olid loodud küll samast perekonnast pärit liigi jaoks, ei õnnestunud kõikidel praimeritel saada spetsiifilist produkti. Jarne & Lagoda (1996) töid välja, mida suurem on liikide geneetilisem erinevus, seda enam väheneb amplifitseerimise tulemuslikkus. *Ligularia hodgsonii* on levinud peamiselt Jaapanis ning Hiinas (Mao et al, 2009), *L. sibirica* aga peamiselt Siberis ning Euroopas (Eichwald et al, 1978) ehk siis 13 praimerist õnnestus amplifitseerida kolm (tabel 4), millega töötati edasi.

Tabel 4. Kobarpea jaoks optimeeritud praimerid.

Nimi	Nukleotiidne järjestus	Saba	Kordus- motiiv	Pikku s	Tempe- ratuur	Sool
Lho64	F: CGAATGACATGAACACCAC R: CCTTCCTCCTTGAGCCTAT	CAGT	(ATG) ₆ ... (AG)rich	160– 195	49	MgCl ₂
Lho77	F: AGTTTTGTAGTAAAACGGAGTT R: CGCATAAATAATGTAAGCA	M13	(TG) ₇	178– 198	55,2	MgCl ₂
Lho114	F: AGTTCGGTTTGCTGCTAT R: TGGGCTTATGGACTTGAT	CAGT	(GA) ₆	220– 235	55,2	MgSO ₄

Edasi viidi läbi PCR 10 µl tuubides, kus kasutati alljärgnevat reaktsioonisegu. Märklaud DNA-ks oli kümnekordselt lahjendatud eraldatud DNA ja TE-puhvri segu lahjendus.

PCR reaktsioonisegu koostis:

- 0,6 µl B2 puhvrit (10x)
- 1,2 µl MgSO₄ (25 mM)või 1,6 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,6 µl dNTP lahust (2,5 mM igat nukleotiidi, kokku 10 mM)
- 0,5 µl pärisuunalist praimerit
- 0,5 µl vastassuunalist praimerit
- 0,5 µl fluorestseeruvat märgist (PET, VIC, NED või FAM)

- 0,05 µl BSA (veise seerumi albumiin, 20 mg/ml)
- 0,05 µl HOT FIREPol DNA polümeraasi (5U/ µl)
- 3,6– 5 µl destilleeritud vett (olenevalt, kumba soola on kasutatud ning kui palju on lisatud märklaud-DNA-d)
- 1– 2 µl märklaud-DNA.

Proovid amplifitseeriti termotsükleris järgmise programmi järgi:

1. Algne denaturatsioon 95 °C 15 minutit.
2. Denaturatsioon 95 °C 1 minut.
3. Praimerite seondumine optimeeritud temperatuuril 1 minut.
4. Ahelate pikendamine 72 °C 1 minut.
5. Etappide 2.- 4. kordamine 35 korda (35 tsüklit).
6. Lõplik DNA ahelate pikendamine 72 °C 10 minutit.

Saadud PCR-i produktid kontrolliti geelelektroforeesil ning säilitati -18 °C juures.

7.5 Fragmentanalüüs

Saadud PCR produktid valmistati ette fragmentanalüüsiks vastavalt McGlaughlin *et al* (2008) protokollile. Paremate tulemuste saamiseks tehti PCR produktidest kümnekordsed lahjendused. Järgmiseks tehti uus lahus 500 µl HiDi formamiidist ning 10 µl suurusstandardist (LIZ500). Lahus segati hoolikalt ning sellest pandi mikrotiiterplaadi igasse kaevu 10 µl. Pärast seda lisati igasse kaevu eelnevalt lahjendatud PCR produktide segu.

Mikrosatelliitide fragmentanalüüs viidi läbi Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia instituudis kapillaarsekvenaatoriga ABI 3730x1 DNA Analyzer.

7.6 Andmete analüüs

Fragmentanalüüsist saadud andmed visualiseeriti programmis Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems) vastavalt eelmises peatükis fragmentanalüüsi jaoks kasutatud suurusstandardile, mille tulemusel saadi amplifitseeritud DNA lõikude pikkused.

Kasutades MS Exceli põhiskirjal programmi GenALEX 6.501 (Peakall & Smouse, 2012), arvutati peamised geneetilise varieeruvuse statistikud: keskmine alleelide arv, populatsioonide eeldatud ja vaadeldud heterosügootsus (H_e ja H_o) ning inbriidingu koefitsent F .

Geneetiliste distantide maatriksit kasutades koostati peakomponentanalüüs (PCoA), Manteli testiga vaadati seost geneetilise kauguse ja geograafilise kauguse vahel. Peale selle uuriti seost geneetilise mitmekesisuse ja populatsiooni suuruste vahel. Samuti viidi läbi hierarhiline AMOVA analüüs, et uurida molekulaarse varieeruvuse jagunemist tasemetega kaupa.

8. Tulemused

Käesolevas töös analüüsiti 118 kobarpea isendit viiest populatsioonist ning uuriti geneetilist varieeruvust nii populatsioonide sees kui populatsioonide vahel.

8.1 Mikrosatelliitide varieeruvus ning geneetiline mitmekesisus

Kokku tuvastati kolme uuritud mikrosatelliit-lookuse kohta 12 alleeli. Alleelide arv oli lookuses keskmiselt 2,3 (3 – 5) ja kolm lookust olid monomorfsed. Kõige varieeruvam oli lookus Lho114, millel tuvastati 5 alleeli. Polümorfsete lookuste osakaal populatsioonis varieerus 66,6%-st kuni 100%-ni. Populatsioonidele iseloomulikke allelele leiti 3, üks Pressi populatsioonis ja kaks Tagula populatsioonis.

Populatsioonide kohta arvutatud geneetilise varieeruvuse parameetrid on toodud tabelis 5. Kõige suurem geneetiline mitmekesisus oli Tagula populatsioonis ($H_e = 0,390$) ja kõige väiksem Sootaga populatsioonis ($H_e = 0,247$). Kõige suurem vaadeldud heterosügootsus oli Tagula populatsioonis ($H_o = 0,543$) ja kõige väiksem Õisu populatsioonis ($H_o = 0,333$). Kõigis uuritud populatsioonides oli vaadeldud heterosügootsus suurem kui eeldatud heterosügootsus, mis näitas, et uuritud populatsioonides ei esine inbriidikut. Inbriidingu koefitsent varieerus ($F = -0,562$) Väägvere populatsioonis kuni ($F = -0,125$) Pressi populatsioonis.

Tabel 5. Uuritud populatsioonide geneetilise varieeruvuse parameetrid: populatsiooni suurus, uuritud isendite arv (N), alleelide arv, keskmine alleelide arv lookuses (Na), vaadeldud heterosügootsus (Ho), eeldatud heterosügootsus (He) ja inbriidingu koefitsent (F).

Populatsioon	Suurus	N	Alleelide arv	Na	Ho	He	F
Väägvere	1200	21	6	2,0	0,460	0,284	- 0,562
Sootaga	1000	25	6	2,0	0,387	0,247	- 0,456
Pressi	850	20	8	2,67	0,350	0,267	- 0,125
Tagula	1500	27	8	2,67	0,543	0,390	- 0,346
Õisu	600	25	7	2,33	0,333	0,251	- 0,231

8.2 Geneetiline ja geograafiline kaugus

Populatsioonide vahel arvutati paarikaupa geneetiline kaugus, mida iseloomustab F_{st} (tabel 6). Eristumise väärtus F_{st} näitab kogu geneetilist varieeruvust, mis eristab kahte populatsiooni.

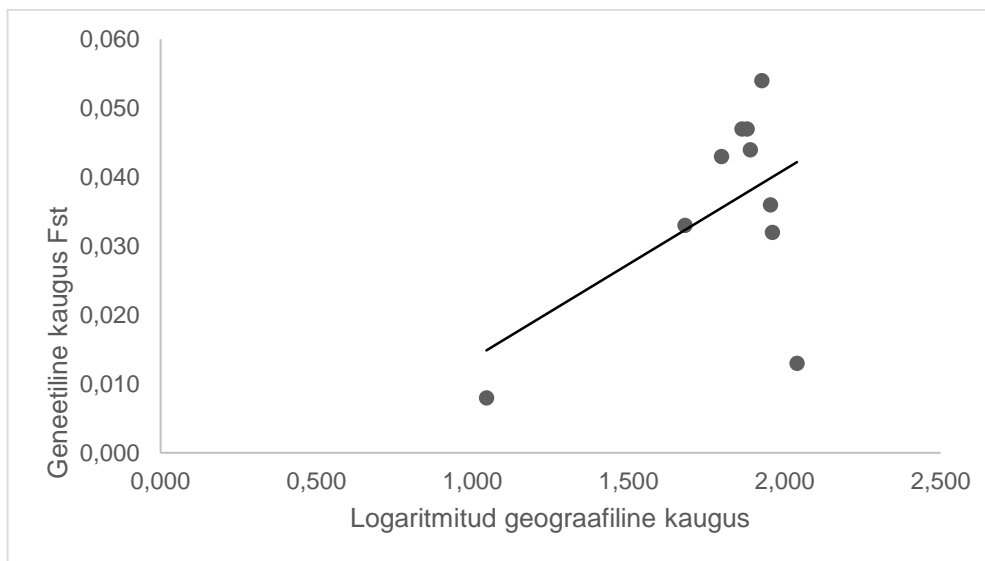
Selle tulemusel eristuvad kõige enam Väägvere ja Õisu populatsioon ($F_{st}= 0,056$) ning kõige vähem eristuvad Väägvere ja Sootaga populatsioon ($F_{st}= 0,008$). Ülejäänud eristumise väärtused jäid vahemikku 0,013 – 0,051.

Tabel 6. Populatsioonide vaheline eristumine F_{st} põhjal.

Väägvere	Sootaga	Pressi	Tagula	Õisu	
0,000					Väägvere
0,008	0,000				Sootaga
0,036	0,032	0,000			Pressi
0,044	0,047	0,033	0,000		Tagula
0,056	0,051	0,013	0,044	0,000	Õisu

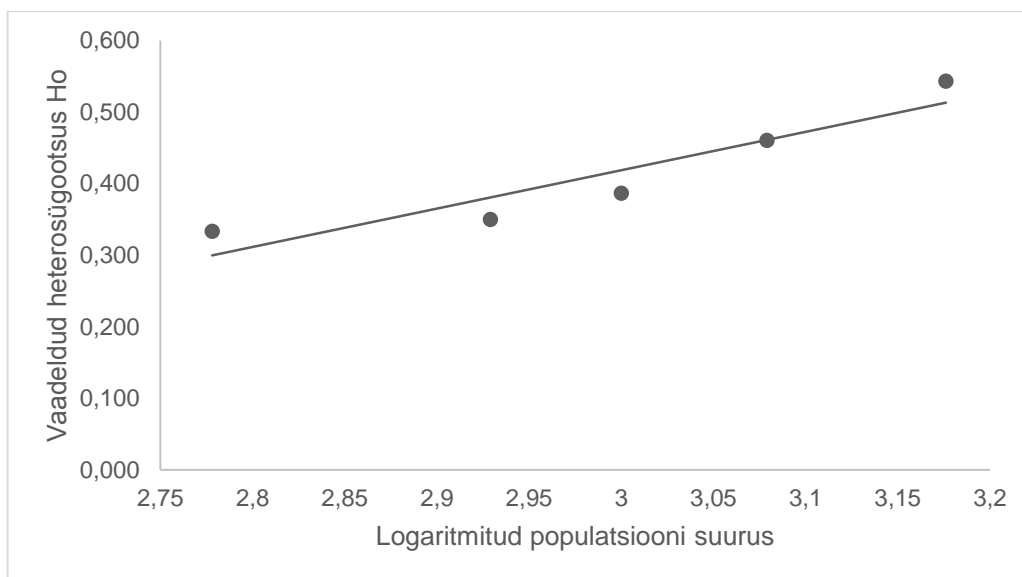
Geograafilise kauguse ja geneetilise kauguse vahelise seose leidmiseks viidi läbi Manteli test (joonis 6). Geneetilise kaugusena kasutati eelpool välja toodud populatsioonide vahelist

eristumise väärtust (F_{st}). Testi tulemused ei tuvastanud seost logaritmitud geograafilise kauguse ning geneetilise kauguse vahel ($r^2 = 0,26$, $p = 0,13$).



Joonis 6. Uuritud populatsioonide geograafiliste ja geneetiliste kauguste seos Manteli testi järgi. Seos ei osutunud statistiliselt oluliseks ($r^2 = 0,26$, $p = 0,13$).

Ühtlasi uuriti seost geneetilise mitmekesisuse ning populatsiooni suuruse vahel (joonis 7). Geneetilise mitmekesisuse näitajana kasutati vaadeldud heterosügootsust H_o ning populatsioonide ligikaudseid suuruseid. Seos osutus statistiliselt oluliseks ($r^2 = 0,87$, $p = 0,02$) ja meie tulemused näitasid, et uuritud kobarpea populatsioonide arvukus on seotud geneetilise mitmekesisusega.



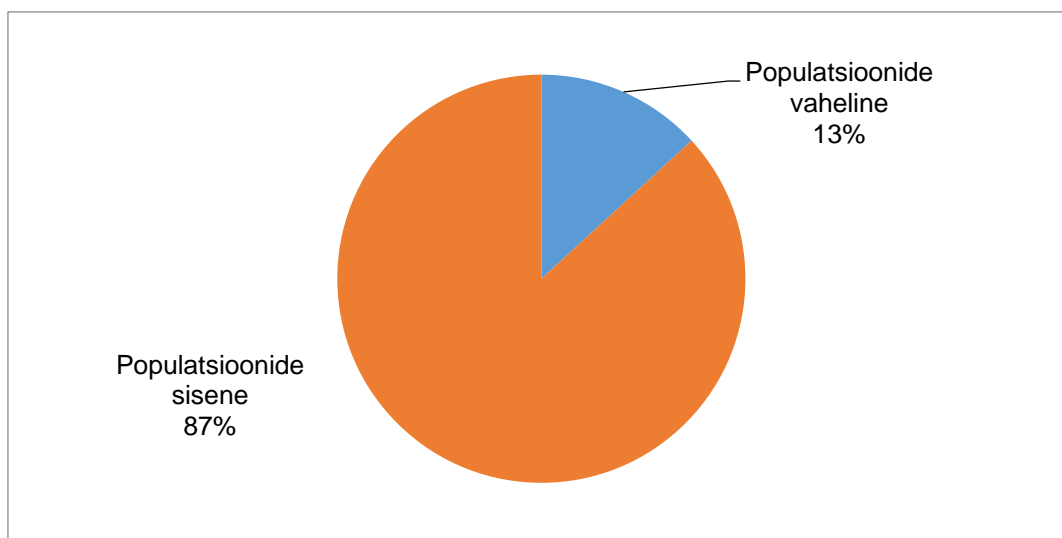
Joonis 7. Populatsioonide suuruse ja vaadeldud heterosügootsuse vaheline seos, mis osutus statistiliselt oluliseks ($r^2 = 0,87$, $p = 0,02$).

8.3 Hierarhiline AMOVA analüüs

Populatsioonide geneetilise varieeruvuse andmetega viidi läbi hierarhiline AMOVA analüüs. Selle tulemusel saadi geneetilise varieeruvuse jaotus erinevatel tasanditel: populatsioonide vahel 13% ja populatsioonide sees 87% (tabel 7, joonis 8). Statistik PhiPT näitas, et populatsioonide vaheline eristumine oli statistiliselt oluline.

Tabel 7. Molekulaarse varieeruvuse analüüsi (AMOVA) tulemused: vabadusastmete arv (df), jääkhajuvuse ruutude summa (SS), keskruut (MS), statistik (PhiPT).

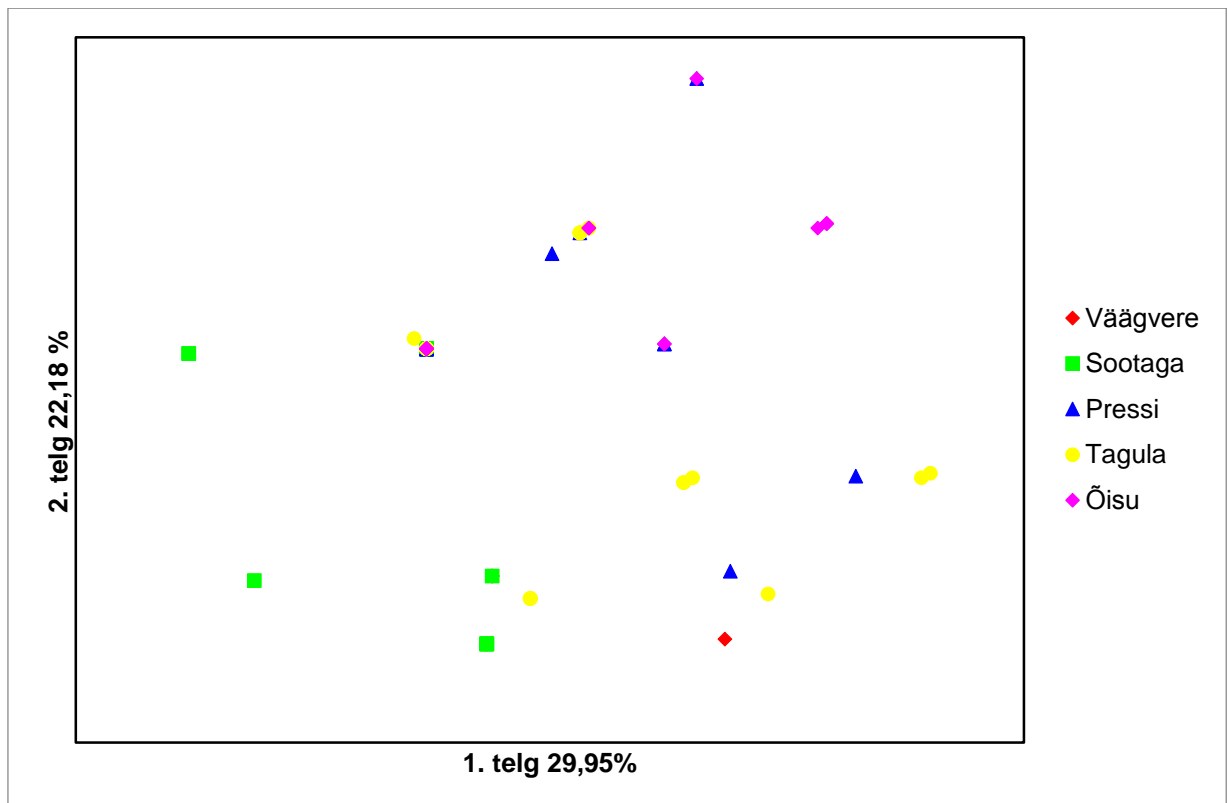
Varieeruvuse tase	df	SS	MS	Varieeruvuse osakaal	PhiPT	p
Populatsioonide vahel	4	9,35	2,34	0,078	0,132	0,001
Populatsioonide sees	113	57,82	0,51	0,51		
Kokku	117	67,17		0,59		



Joonis 8. Molekulaarse varieeruvuse jaotumine tasemete vahel.

8.3 Peakomponentanalüüs

Peakomponentanalüüs viidi läbi geneetiliste kauguste maatriksi põhjal, mis koostati indiviidide kohta. Esimesed kaks telge kirjeldavad kokku 52,13% kogu varieeruvusest (joonis 9).



Joonis 9. Indiviidide ja populatsioonide eristumine geneetiliste distantside põhjal.

9. Arutelu

9.1 Populatsioonide geneetiline mitmekesisus

Eestis on varem kobarpead geneetiliselt uuritud AFLP markeritega (Ilves *et al*, 2013). Kuna eelpool nimetatud markerid on oma iseloomult dominantsed, ei saa nendega arvutada vaadeldud (H_o) ja eeldatud heterosügootsust (H_e), millega on võimalik kõige paremini iseloomustada geneetilist mitmekesisust. Siiski saab üle võimalusena kasutada polümorfsete lookuste arvu. AFLP markeritega saadi polümorfsete lookuste osakaaluks 24 – 67%, millest kõige vähem polümorfsemad olid Õisu ja Pressi populatsioonid, ning kõige polümorfsem oli Tagula populatsioon. Taoline jaotumine oli ka populatsioonile ainulaadsete lookuste kohta: kõige vähem leiti neid Õisus, kus neid oli kaks, ja Väägveres ja Sootagas, kus neid oli kolm. Kõige rohkem oli neid Tagulas, kus ainulaadseid lookuseid oli viis. Käesolevas töös saadi keskmiseks polümorfsete lookuste osakaaluks 66,7 – 100%, mis on suurem kui AFLP markerite puhul. Kõige vähem polümorfsemad olid Väägvere, Sootaga ja Õisu, kus kaks lookust kolmest olid polümorfseid, ning kõige rohkem polümorfsemad olid Pressi ja Tagula,

kus kõik uuritud lookused olid polümorfseid. Selle põhjal saab öelda, et mõlema markeri järgi on Tagula populatsioon kõige mitmekesisem ning Õisu on kõige monomorfsem.

Kobarpead on põhjalikult uuritud Tšehhis ja Slovakkias, kus populatsioonides on isendeid 85 – 28 000. Sealseid populatsioone uuriti kodominantsete allosüümidega ning nende alusel arvutati vaadeldud ja eeldatud heterosügootsus. Väiksemates populatsioonides, kus on umbes sama palju isendeid, kui Eestis, oli eeldatud heterosügootsus vahemikus 0,238 – 0,329 ning vaadeldud heterosügootsus 0,250 – 0,418. Meie tulemuse järgi olid Eestis vastavad numbrid 0,247 – 0,390 ja 0,333 – 0,543 ehk väga sarnased. Eeldatud ja vaadeldud heterosügootsus mõõdavad populatsioonisisest geneetilist mitmekesisust. Kobarpea on isesobiv võõrtolmleja ehk segatolmleja (Šmídová *et al*, 2010), mis tähendab, et tolmllemisel võivad tolmuterad olla pärit samalt taimelt või teiselt taimelt. Meie tulemused näitavad, et Eesti populatsioonides on suhteliselt hea geneetiline mitmekesisus ning võib eeldada, et domineerib võõrtolmlemine ja isetolmlemine ei ole väga levinud.

Inbriidingu suurust saab kirjeldada inbriidingu koefitsendi (F) põhjal (Reed & Frankham, 2003). Inbriidingu koefitsent varieerub -1...+1. Negatiivsemad väärtused iseloomustavad võõrtolmlejaid ja positiivsed väärtused isetolmlejaid. Tšehhi ning Slovakkia populatsioonides jäi inbriidingu koefitsent väiksemates populatsioonides -0,332 – 0,073, aga rohkem oli negatiivse väärtusega populatsioone. Eestis oli inbriidingu koefitsent vahemikus -0,125 – - 0,562. Sellest võib järeldada, et uuritud Eesti populatsioonid ei ole inbriidsed ning ei kannata sellest tuleneva inbriidingu depressioonis, vaid on elujõulised. Samas peab märkima, et meie uuringusse olid hõivatud suuremad populatsioonid, arvukusega alates 600 indiviidist. Populatsiooni peetakse elujõuliseks, kui selle arvukus ei ole vähem kui 500 indiviidi, kuid stabiilseks püsijäämiseks pakutakse arvu 5,000 (Flather *et al*, 2011). Seega kõik uuritud populatsioonid olenemata oma suurusest on hetkel heas seisundis, mida kinnitasid geneetilised parameetrid.

9.2 Populatsioonide eristumine

Eelneva uuringu (Ilves *et al*, 2013) peakomponentanalüüsis, mis oli koostatud Jaccardi indeksi põhjal, eristusid mõned populatsioonid hästi, kuid esines Sootaga ja Tagula ning Väägvere ja Jõhvi populatsioonide osaline kattumine. Käesolevas töös ei eristunud populatsioonid peakomponentanalüüsis ning paljud geneetiliselt monomorfseid isendid

langesid graafikul kokku. Seetõttu eristuvad graafikul paremini geneetiliselt polümorfsemad isendid (joonis 9).

Populatsioonide vaheliseks eristumiseks oli Ilves *et al* (2013) töös arvatud fikseerumisindeksi (F_{st}) analoog Φ_{st} , mis varieerus vahemikus 0,245 – 0,571. Kõige väiksem erinevus oli Sootaga ja Tagula populatsiooni vahel ja kõige suurem Anne ja Õisu populatsiooni vahel, Pressi ja Õisu puhul oli $\Phi_{st} = 0,476$. Käesolevas töös oli F_{st} väärtus vahemikus 0,008 – 0,056. Kõige väiksem erinevus oli Sootaga ja Väägvere vahel ja kõige suurem varieeruvus Väägvere ja Õisu vahel. Käesolevas töös ei leitud, et populatsioonid oleksid omavahel eristunud ning seda toetavad nii peakomponentanalüüsi tulemused kui ka populatsioonide vahelised eristumise väärtused.

Ilves *et al* (2013) AMOVA tulemusel saadi, et 59% molekulaarsest varieeruvusest jääb populatsioonide vaheliseks ning 41% seletab ära populatsioonide sisene erinevus. Käesolevas töös AMOVA tulemusel seletas ära 13% populatsioonide vaheline erinevus, mis näitab seda, et populatsioonid ei ole omavahel väga erinevad, ning 87% seletas ära populatsioonide sisene varieeruvus, mis näitab, et isendid, mis on samas populatsioonis, on omavahel varieeruvad. See tulemus on kooskõlas üldise teoreetilise seisukohaga, et allogaamsete ehk võõrtolmlevate taimede puhul on populatsioonisisene varieeruvus suur, kuid populatsioonid on omavahel suhteliselt sarnased (Hamrick, 1983).

9.3 Geneetiline ja geograafiline kaugus

Meie uurimuse Manteli test, mis oli tehtud populatsioonide vaheliste kauguste ja geneetiliste kauguste (F_{st}) vahel, ei osutunud statistiliselt oluliseks. Kõige lähemad populatsioonid asusid teineteisest 11,1 km kaugusel (Väägvere ja Sootaga) ning kõige kaugemad 109,8 km kaugusel (Õisu ja Pressi), kuid nende geneetiline eristumine ei muutunud sellest palju. Samas näitasid meie andmed, et kõige lähemal asuvad populatsioonid – Väägvere ja Sootaga – eristusid teineteisest eristumise väärtuse (F_{st}) põhjal kõige vähem, mis viitab sellele, et geograafiliselt lähedaste populatsioonide vahel võib kergemini toimuda geneetilise materjali vahetust. Eesti populatsioonide AFLP uuring (Ilves *et al*, 2013) ei tuvastanud samuti seost geograafilise kauguse ja populatsioonide geneetilise eristumise vahel. Seega mõlemad molekulaarsed markerid pigem näitavad, et isegi kauged kobarpea populatsioonid suudavad suhteliselt edukalt omavahel ühendust hoida, kas siis õhu või vee kaudu. Peale selle võib oletada, et regulaarne looduskaitse seire, mille raames uurijad külastavad järjest

erinevaid populatsioone, panustab samuti geenülekandesse, kas siis tolmuterade või seemniste näol.

Oodatult leiti seos geneetilise mitmekesisuse (H_o) ja populatsiooni suuruste vahel, mis näitab, et suuremates populatsioonides on suurem mitmekesisus ning väiksemates madalam mitmekesisus. Sama seos leiti ka Ilves *et al* (2013) töös, kus populatsiooni suurus oli seotud nii polümorfsete lookuste arvu kui ka keskmiste alleelide arvuga lookuses. Meie tulemused tõestasid veel kord populatsiooni suuruse ja arvukuse olulisust.

9.4 Liigikaitse

Käesolev töö näitas, et viies uuritud kobarpea populatsioonis on olukord hetkel stabiilne ning sealsed isendid on elujõulised. Siiski tasuks välja tuua, et paari aastakümne jooksul on paljud kobarpea just väiksemad populatsioonid hävinud (Kukk, 2003) põhiliselt antropogeensete mõjutuste pärast. Seire andmed 2012. a seisuga tuvastasid, et uuritud elujõulisi populatsioone ohustab kõige enam maade kuivendamine, kasvukohtade võsastumine ja konkurentsivõimelisemate taimede pealetung. Nende ohutegurite tase oli enamasti hinnatud kui nõrk või keskmine. Seega, hetkel uuritute suuremate populatsioonide seisukord on hea, mis aga ei tähenda, et nende tulevik on kindlustatud.

Mõnedes uuritud populatsioonides, näiteks Õisu ja Pressi, oli indiviidide arvukus alumise turvalise piiri lähedal, mis tähendab, et iga väike keskkonnatingimuste muutus võib mõjuda drastiliselt populatsiooni saatusel. Järelikult tuleks kasvukohtades kindlasti järgida koostatud kaitse-eeskirju ning mõne aja pärast üle vaadata populatsioonidünaamikat, kaasaarvatud geneetilist mitmekesisust.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida hariliku kobarpea (*Ligularia sibirica* (L.) Cass.) populatsioonisisest ning populatsioonide vahelist geneetilist mitmekesisust; kas ja kui palju populatsioonid eristuvad teineteisest ja tuvastada seos geneetilise mitmekesisuse ja populatsioonide suuruste vahel.

Mitmekesisuse tuvastamiseks kasutati kolme polümorfset mikrosatelliit-lookust. Analüüsis uuriti viite suuremat kobarpea populatsiooni – Väägvere, Sootaga, Õisu, Pressi ja Tagula – ning proovid võeti kokku 118 indiviidilt.

Kõige suurem mitmekesisus oli Tagula populatsioonis, mis oli oma suuruse poolest kõige arvukam, ning kõige väiksem oli mitmekesisus Õisu populatsioonis, mis oli oma suuruse poolest kõige väiksem. Geneetilise mitmekesisuse ja populatsioonisuuruse vaheline seos ostutus oluliseks, mis näitab, et väiksemates populatsioonides on väiksem mitmekesisus ning madalam elujõulisus.

Uuritud populatsioonid ei eristunud selgelt omavahel geneetiliselt ning saadi, et suurem osa molekulaarsest varieeruvusest on populatsioonisisene. See on kooskõlas seisukohaga, et võõrtolmlevatel taimedel on suur populatsioonisisene varieeruvus, aga väike populatsioonide vaheline eristumine.

Kobarpea võõrtolmlemist kinnitas samuti inbriidingu koefitsent, mille järgi uuritud populatsioonides ei ole levinud isetolmlemine ning sellest tulenev inbriidingu depressioon. Siiski tuleb mainida, et uuritud oli suuremaid elujõulisi populatsioone, kuid mõned nendest ei ole piisavalt suured, et olla stabiilsed.

Töö peamine hüpotees, mis väits, et väiksemates populatsioonides on väiksem geneetiline mitmekesisus, sai kinnituse. Hüpoteesi teine osa, mille kohaselt oleks pidanud väiksemates populatsioonides esinema inbriidingu depressioon, kinnitust ei saanud, sest isegi väiksemates uuritud populatsioonides olid head geneetilise varieeruvuse parameetrid ning negatiivse väärtusega inbriidingu koefitsent ehk siis võib oletada, et meie uuritud väiksemad populatsioonid olid ikkagi piisavalt suured, et säilitada oma geneetilist varieeruvust.

Summary

The genetic diversity of relict siberian groundsel (*Ligularia sibirica* (L.) Cass.) in Estonia

The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of siberian groundsel (*Ligularia sibirica* (L.) Cass.) within and among populations and describe, how much the populations differ from each other and detect a correlation between genetic diversity and population size.

To detect genetic diversity we used three polymorphic microsatellite markers. We analyzed five larger populations of the siberian groundsel – Väägvere, Sootaga, Õisu, Pressi and Tagula – and collected samples from 118 individuals.

We found the correlation between genetic diversity and population size. The highest level of genetic diversity was found in Tagula population, which is also the largest population, and lowest level of genetic diversity was found in Õisu population, which was the smallest population.

The principal component analysis and the genetic distance among populations showed that the populations do not differentiate from each other and the results of analysis of molecular variance revealed that most of the molecular variation is within populations. It is in accordance with current conception that outcrossing species have larger levels of diversity within populations and lower levels of differentiation among populations.

Our study showed that siberian groundsel is an outcrossing species, because of the negative values of fixation index. It also suggests that studied populations do not suffer from inbreeding depression. Still it is worth to mention that we studied bigger and viable populations but that does not mean some of them are big enough to be stable.

The main hypothesis of this study was to show that smaller populations have lower level of genetic diversity and it proved to be correct. The other half of the hypothesis was to show that smaller populations suffer from inbreeding depression proved to be incorrect, because they showed good level of genetic diversity and negative values of fixation index.

Tänuavaldused

Sooviksin tänada kuldse kannatlikkuse ning igakülgse abi eest oma juhendajat Tatjana Oja. Peale selle tahan tänada Maris Mägi välitöödel käimise ning taimse materjali korjamise eest ning Margarita Mürki ja Marge Thetloff'i abi eest laboratoorsel tööl ja andmetöötusel.

Kasutatud kirjandus

- Aguilar, R., Quesado, M., Ashworth, L., Herrerias- Diego, Y. & Lobo, J. 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches.- *Molecular Ecology* 17: 5177-5188.
- Charlesworth, D. 2003. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations.- *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 358: 1051-1070.
- Charlesworth, D. & Willis, J. H. 2009. The genetics of inbreeding depression.- *Nature Reviews Genetics* 10: 783-796.
- Cullings, K.W. 1992. Design and testings of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1: 233-240.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Germann, G. A. 1807. Verzeichniss der Pflanzen des botanischen Gartens der kaiserlichen Universitat zu Dorpat, im Jahr 1807. M.G. Grenzius, Dorpat, pp 1-143.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F. & Petit, J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping.- *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.
- Eichwald, K. Kask, M., Kuusk, V., Laasimer, L., Lellep, E., Peikel, E., Rebassoo, H., Rimmel, A., Süvalepp, A., Talts, S., Võsamäe, H., Üksip, A. 1978. Eesti NSV floora. VI. Valgus, Tallinn.
- Escudero, A., Iriondo, J. M. & Torres, M. E. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation.- *Biological Conservation* 113: 351-365.
- Flather, C. H., Hayward, G. D., Beissinger, S. R. & Stephens, P. A. 2011. Minimum viable populations: is there a 'magic number' for conservation practitioners.- *Trends in Ecology and Evolution* 26: 307-309.

Hale, M. L., Burg, T. M. & Steeves, T. E. 2012. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies.- PLoS ONE 9: e45170 doi:10.1371/journal.pone.0045170.

Hamrick, J. L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: Schonewald-Cox, C. M., Chambers, S. M., MacBryde, B. & Thomas, W. L. (eds.), Genetics and conservation. Benjamin-Cummings, London, UK, pp: 335-348.

Hamrick, J. L. & Godt, M. J. W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species.- Philosophical Transactions of the Royal Society B 351: 1291-1298.

Heinken-Šmídová, A & Münzebergová, Z. 2012. Population Dynamics of the Endangered, Long-Lived Perennial Species, *Ligularia sibirica*.- Folia Geobotanica 47: 193-214.

Hendrych, R. 2003. On the occurrence of *Ligularia sibirica* in Bohemia.- Preslia, Praha 75: 39-61.

Ilves, A., Lanno, K., Sammul, M. & Tali, K. 2013. Genetic variability, population size and reproduction potential in *Ligularia sibirica* (L.) populations in Estonia.- Conservation Genetics 14: 661–669.

Jacquemyn, H., De Meester, L., Jongejans, E. & Honnay, O. 2012. Evolutionary changes in plant reproductive traits following habitat fragmentation and their consequences for population fitness.- Journal of Ecology 100: 76-87.

Jarne, P. & Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back.- Trends in Ecology and Evolution 11: 424-429.

Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R. & Dhawan, A. K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants.- Euphytica: 177 309-334.

Kobiv, Y. 2005. *Ligularia sibirica* (L.) Cass. (*Asteraceae*) in the Chornohora mountains (Ukrainian Carpathians): population-ontogenetic parameters, morphology, taxonomy and conservation.- Ukrainian Botanical Journal 3: 383-395.

Kukk, Ü. 2003. The distribution of *Ligularia sibirica* (L.) Cass. In Estonia and changes in its population.- Biuletyn Ogródów Botanicznych 12:11–22.

Kukk, T. & Kull, T. 2005. Eesti taimede levikuatlas.- EMÜ põllumajandus- ja keskkonna-instituut, Tartu.

Lanno, K & Sammul, M. 2013. The Survival of Transplants of Rare *Ligularia sibirica* in Enhanced by Neighbouring Plants.- Folia Geobotanica DOI 10.1007/s12224-013-9163-3.

Leimu, R., Mutikainen, P., Korocheva, J. & Fischer, M. 2006. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation?.- Journal of Ecology 94: 942-952.

Liu, J.-Q. 2004. Uniformity of karyotypes in *Ligularia* (Asteraceae: Senecioneae), a highly diversified genus of the eastern Qinghai-Tibet Plateau highlands and adjacent areas.- Botanical Journal of the Linnean Society 144: 329-342.

Liu, J.-Q., Wang, Y.-J., Wang, A.-L., Hideaki, O. & Abbott, R. J. 2006. Radiation and diversification within the *Ligularia-Cremanthodion-Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered by uplift of the Quinghai-Tibetan Plateau.- Molecular Phylogenetics and Evolution 38: 31-49.

Liu, S.-W., Deng, D.-S. & Liu, J.-Q. 1994. The origin, evolution and distribution of *Ligularia* Cass. (Compositae).- Acta Phytotaxonomica Sinica 32: 514-524.

Mănzău, C., Gherghel, I., Zamfirescu, S., Zamfirescu, O., Roșca, I. & Strugariu, A. 2013. Current and future potential distribution of glacial relict *Ligularia sibirica* (Asteraceae) in Romania and temporal contribution of Natura 2000 to protect the species in light of global change.- Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences 8: 78-87.

Mao, C., Pan, Y., Wang, J. & Gong, X. 2009. Isolation and characterization of a microsatellite markers for *Ligularia hodginsonii* Hook. (Asteraceae). Conservation Genetics 10: 1853-1855.

Matei, A. N. 2014. Phytosociological study concerning associations with *Ligularia sibirica* (L.) Cass. in Romania.- Current Trends in Natural Sciences 3: 54-60.

McGlaughlin, M. E., Wallace, M. E. & Helenurm, K. 2008. Isolation of microsatellite loci from the endangered plant *Sibara filifolia* (Brassicaceae).- Molecular Ecology Resources 8: 367-369.

Neblea, M. 2009. Phytosociological researches concerning habitats with *Ligularia sibirica* (L.) Cass. from Meridional Carpathians.- Scientific Annals of Alexandru Ioan Cuza University of Iasi 55: 145-154.

Oostermeijer, J. G. B., Luijten, S. H. & den Nijs, J. C. M. 2003. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation.- Biological Conservation 113: 389-398.

Ouborg, N. J., Vergeer, P. & Mix, C. 2006. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants.- Journal of Ecology 94: 1233-1248.

Pan, Y., Shi, S., Gong, X. & Kuroda, C. 2008. A Natural Hybrid Between *Ligularia paradoxa* and *L. duciformis* (Asteraceae, Senecioneae) From Yunnan, China.- Annals of the Missouri Botanical Garden 95: 487-494.

Parida, S. K., Anand Raj Kumar, K., Dalal, V., Singh, N. K. & Mohapatra, T. 2006. Unigene derived microsatellite markers for the cereal genomes. Theoretical and Applied Genetics 112: 808-817.

Peakall, R. & Smouse, P. E. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research – an update.- Bioinformatics 28: 2537-2539.

Reed, D. H. & Frankham, R. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity.- Conservation biology 17: 230-237.

Riigiteataja 1936, 49, 408. Looduskaitse nõukogu otsus taimede kaitseks 11. mai 1936.

Riigiteataja 2006, 13, 210. Hariliku kobarpea püsielupaikade kaitse alla võtmine ja kaitse-eeskiri. Keskkonnaministri 25. jaanuari 2006. määrus nr 8.

Sammul, M. 2001. Harilik kobarpea. Kaitsekorralduskava 2002-2006. Tartu, pp 1-27.

Šmídová, A., Münzebergová, Z. & Plačková, I. 2011. Genetic diversity of a relict plant species, *Ligularia sibirica* (L.) Cass. (Asteraceae).- Flora 206: 151-157.

Yu, J., Kuroda, C. & Gong, X. 2014. Natural Hybridization and Introgression between *Ligularia cymbulifera* and *L. tongolensis* (Asteraceae, Senecioneae) in Four Different Locations.- PloS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0115167

Kasutatud veebiaadressid

Applied Biosystems. Peak Scanner Software v1.0

[<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software-community/free-ab-software.html>]. 8. september 2014.

Eesti Entsüklopeedia. 2011. Harilik kobarpea.

[http://entsyklopeedia.ee/artikkel/harilik_kobarpea]. 15. märts 2014.

E-elurikkus. Harilik kobarpea.

[http://elurikkus.ut.ee/kirjeldus.php?lang=est&id=19160&rank=70&id_puu=19160&rank_puu=70]. 15. märts 2014

Eesti Punane Raamat. 2008. Eesti Teaduste Akadeemia Looduskaitse Komisjon.

[<http://elurikkus.ut.ee/prmt.php?lang=est>]. 14. veebruar 2014.

Nobis, M. Języczka Sybersyjska *Ligularia sibirica* monitoring.

[<http://pl.scribd.com/doc/263232737/J%C4%99zyczka-Syberyjska-Ligularia-Sibirica-Monitoring-Przewodnik-metodyczny-1758#scribd>]. Kasutatud 13. veebruar 2015.

Portal ISOP. [http://portal.nature.cz/c1/c1_druh.php?akce=view&id=324]. 13.

veebuar 2015.

Lisad

LISA 1

Hariliku kobarpea püsielupaikade kaitse alla võtmine ja kaitse-eeskiri

Vastu võetud 25.01.2006 nr 8jõustumine 06.02.2006

Määrus kehtestatakse «Looduskaitseseaduse» § 10 lõike 2 alusel.

§ 1. Kaitse alla võtmise eesmärk

Määrusega võetakse kaitse alla Vabariigi Valitsuse 20. mai 2004. a määruse nr 195 «I ja II kaitsekategooriana kaitse alla võetavate liikide loetelu» § 1 lõike 2 punkti 12 kohaselt I kaitsekategooriasse kuuluva liigi hariliku kobarpea (*Ligularia sibirica* (L.) Cass.) väljaspool kaitsealasad asuvad elupaigad, mida tuleb kaitsta selle liigi soodsa seisundi tagamiseks.

§ 2. Hariliku kobarpea püsielupaikade kaitse alla võtmine

(1) Kaitse alla võetakse järgmised hariliku kobarpea püsielupaigad:

- 1) Edise Ida-Viru maakonnas Kohtla vallas Kukuruse külas;
- 2) Jõhvi Ida-Viru maakonnas Jõhvi vallas Kotinuka külas;
- 3) Sootaga Tartu maakonnas Tartu vallas Sootaga külas;
- 4) Kikaste Tartu maakonnas Luunja vallas Kavastu ja Kikaste külas;
- 5) Väägvere Tartu maakonnas Tartu vallas Kikivere külas;
- 6) Tagula Valga maakonnas Tõlliste vallas Tagula külas.

(2) Sootaga püsielupaik jaguneb Sootaga 1 ja Sootaga 2 sihtkaitsevööndiks.

(3) Hariliku kobarpea püsielupaikade piirid on esitatud määruse lisas olevatel kaartidel².

§ 3. Püsielupaiga valitseja

«Looduskaitseseaduse» § 21 lõike 1 kohaselt on püsielupaiga valitsejaks Keskkonnaamet.
[RTL 2009, 11, 131 - jõust. 01.02.2009]

§ 4. Kaitsekord

(1) Püsielupaiga maa-ala kuulub sihtkaitsevööndisse.

(2) Püsielupaigas kehtib «Looduskaitseaduses» sätestatud kaitsekord käesoleva määruse erisustega.

(3) Püsielupaigas on lubatud:

- 1) inimeste viibimine;
- 2) marjade ja seente kogumine;
- 3) jahipidamine;
- 4) kalapüük.

(4) Enam kui 30 inimese viibimine ja rahvaürituste korraldamine püsielupaigas on lubatud ainult püsielupaiga valitseja nõusolekul.

(5) Kopra arvukuse reguleerimine Sootaga püsielupaigas on lubatud püsielupaiga valitseja igakordsel kirjalikul nõusolekul.

(6) Püsielupaiga valitseja igakordsel kirjalikul nõusolekul on lubatud veerežiimi muutmine hariliku kobarpea elutingimuste säilitamiseks või parandamiseks.

(7) Püsielupaiga valitseja nõusolekul on Sootaga püsielupaiga Sootaga 1 sihtkaitsevööndis ja Tagula püsielupaigas lubatud metsa esinemisalal metsakoosluse kujundamine vastavalt hariliku kobarpea kaitse eesmärgile, võttes arvesse järgmisi piiranguid:

- 1) metsa on lubatud majandada ainult püsimetsana, mis jäetakse looduslikule uuenemisele;
- 2) metsa I ja II rinde ühist liituvust ei ole lubatud vähendada alla 0,6;
- 3) metsamajandamistöid on lubatud teha ainult külmunud pinnasel.

(8) Hariliku kobarpea elutingimuste säilimiseks ja parandamiseks tuleb Edise ja Jõhvi püsielupaigas ning Sootaga püsielupaiga Sootaga 2 sihtkaitsevööndis harvendada puu- ja põõsarinet, arvestades järgmisi tingimusi:

- 1) puu-ja põõsarinde lubatud liituvus on 0,4–0,6;
- 2) puurinde harvendamisel tuleb jätta kasvama vanemad puud;
- 3) raietööd ning puidu kokku- ja väljavedu külmumata pinnasel on keelatud.

(9) Harvendatud puu- ja põõsarindega alasid Edise, Jõhvi, ja Sootaga püsielupaiga Sootaga 1 sihtkaitsevööndis tuleb harvendamise järgselt niita igal aastal ajavahemikus 10. augustist 20. septembrini, jättes kasvama hariliku kobarpea taimed.

(10) Hariliku kobarpea elutingimuste parandamiseks on vajalik säilitada ning taastada poollooduslikke kooslusi, tõrjuda võsa ja niita heina, arvestades järgmisi tingimusi:

1) Tagula püsielupaigas on vaja allikasoo esinemisalal hoida puu- ja põõsarinde liituvus alla 0,2;

2) Sootaga püsielupaiga Sootaga 1 sihtkaitsevööndis on vaja poollooduslike koosluste esinemisalal hoida puu- ja põõsarinde liituvus alla 0,4;

3) Väägvere ja Kikaste püsielupaigas on vaja tõrjuda võsa ja poollooduslike koosluste esinemisalad igal aastal niita ajavahemikus 10. augustist 20. septembrini;

4) Jõhvi püsielupaigas on vaja tõrjuda võsa ja võsatõrje järel niita rohtu igal aastal ajavahemikus 10. augustist 20. septembrini jättes kasvama hariliku kobarpea taimed.

(11) Püsielupaigas hooldustööde käigus niidetud hein ja raiutud põõsad tuleb eemaldada hariliku kobarpea taimede esinemisaladelt 10 päeva jooksul pärast niitmist või raiumist.

¹EÜ nõukogu direktiiv 92/43/EMÜ looduslike elupaikade ning loodusliku loomastiku ja taimestiku kaitse kohta (EÜT L 206, 22.07.1992, lk 7–50; C 241, 29.08.1994, lk 175; L 305, 08.11.1997, lk 42–65; L 236, 23.09.2003, lk 667–702; L 284, 31.10.2003, lk 1–53).

²«Looduskaitseaduse» § 53 lõike 2 kohaselt ei avaldata Riigi Teatajas püsielupaikade kaarte, nendega saab tutvuda Keskkonnaametis, Keskkonnaministeeriumis, keskkonnaregistris ning maainfosüsteemis (www.maaamet.ee).

[RTL 2010, 18, 316 - jõust. 12.04.2010]

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Laura Valgma,

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

Reliktse hariliku kobarpea *Ligularia sibirica* (L.) Cass. geneetiline mitmekesisus Eestis,

mille juhendaja on Tatjana Oja,

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

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

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

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

Tartus, **27.05.2015**