

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Mükoloogia õppetool

Annika Suu

**Perekonda *Abrothallus* kuuluva lihhenikoolse seene
määramine islandi käokõrva (*Cetraria islandica*) tallustest**

Magistritöö

Juhendaja: Ave Suija, Ph.D.

Tartu 2014

Sisukord

Sissejuhatus	3
1. Lihhenikoolsed seened	5
2. Endolihhenikoolsed seened ja bakterid	5
3. Uurimismeetodid	6
4. Materjal ja meetodika.....	11
4.1. Uuritavad liigid	11
4.2. Materjali kogumine.....	12
4.3. Proovide ettevalmistamine molekulaarseks analüüsiks	13
4.4. Praimerite disain	14
4.5. Lihhenikoolse seene määramine islandi käokõrva tallustest	17
5. Tulemused	19
5.1. Disainitud praimerid	19
5.2. <i>Abrothallus</i> sp. islandi käokõrva tallustes	22
5.2.1. RISA ja sekveneerimise tulemused.....	22
5.2.2. Praimerid ja geelitihedused	24
5.3. Seene <i>Abrothallus</i> sp. levik isendi ja transekti piires	24
6. Arutelu	27
Kokkuvõte	30
Summary.....	32
Tänuavaldused.....	34
Kasutatud kirjandus	35
Lisad	42

Sissejuhatus

Ligikaudu 74 000-st kaasajal eksisteerivast seeneliigist umbes 1/5 moodustab samblikke (Hawksworth 2001). Enamasti defineeritakse samblikku kui sümbiontset liitorganismi, kus üheks partneriks on seen (kottseen (*Ascomycota*) või (*Basidiomycota*)) ja teiseks, fotosünteesivaks partneriks, kas rohevetikas (*Chlorophyta*) või tsüanobakter (*Cyanobacteria*) (Honegger 2012, Richardson 1999). Nii nagu paljude teiste organismide puhul, on ka selles kooselus tegelikult rohkem osapooli. Näiteks fotobiondina rohevetikat sisaldavas samblikutalluses võib samal ajal leiduda ka tsüanobaktereid, kes moodustavad sambliku pinnal või sees tsefalooide (Hawksworth 1988, Randle & Saag 2004). Lisaks võivad samblikes elada endolihhenikoolsed ja lihhenikoolsed seened (Honegger 2012, Richardson 1999) ning mitmed bakterid (Cardinale *et al.* 2006). Samblikega assotsieerunud organismidest on enim uuritud lihhenikoolseid seeni; endolihhenikoolseid seeni ja baktereid on tõsisemalt uurima hakatud viimasel kümnendil (Honegger 2012).

Lihhenikoolsed seened on polüfüleetiline rühm seeni, kes elavad samblikel parasiidi, saprotroofi või kommensaalina. Enamasti määratakse lihhenikoolsete seente olemasolu samblikes kas viljakehade esinemise või samblikule tekitatud kahjustuste järgi (Lawrey & Diederich 2003), mistõttu nende puudumisel on lihhenikoolsete seente esinemist samblikes raske määrata. Sama probleem ilmneb ka enamuse teiste seente puhul, mistõttu seente tegelikku levikut maastikus või peremees-organismis on keeruline määrata (Gardes & Bruns 1996, Grundy *et al.* 2012). Seene viljakehade puudumine ei tähenda veel, et antud seeneliik uuritavas piirkonnas või organismis puudub ning populatsioonide tegelik suurus võib viljakehade puudumisel jääda selgusetuks (Gardes & Bruns 1996). Populatsiooni suuruse määramine võib osutada keerukaks ka seentel elunevate (fungikoolsete), sh samblikel elunevate (lihhenikoolsete) seente puhul, kuna vaatlusel põhinevad meetodid (nt. valgusmikroskoopia koos erinevate värvimistehnikatega) ei pruugi alati võimaldada peremehe ning selle sees elunevate seente hüüfide eristamist (de los Ríos *et al.* 2002, Fahselt *et al.* 2001).

Käesoleva töö objektideks on lihhenikoolne seen perekonnast *Abrothallus* (*Dothideomycetes*, *Ascomycota*) ning tema peremees-samblik islandi käokõrv (*Cetraria islandica*; *Lecanoromycetes*, *Ascomycota*). Perekonda *Abrothallus* kuuluvad seened on kogu maailmas suhteliselt laialt levinud (Perez-Ortega *et al.* 2014) ning moodustavad peremees-samblikel

musti, poolkerajaid, sageli roheline härmakihiga viljakehi, tänu millele on neid seeni looduses suhteliselt lihtne märgata ja ära tunda.

Töö eesmärgiks on töötada välja meetodika, mis võimaldaks määrata perekonda *Abrothallus* kuuluva lihhenikoolse seene olemasolu samblikus ka juhul, kui taksoni esinemisele viitavad välistunnused puuduvad.

- Töö esimeses osas antakse lühike ülevaade lihhenikoolsetest ja endolihhenikoolsetest seentest ning samblikes esinevatest bakteritest ja nende uurimisel senini kasutatud uurimismeetoditest.
- Töö praktilise osa esimese etapi eesmärgiks on disainida praimerid, mis sobiksid sugukonna *Parmeliaceae* (*Ascomycota*) esindajatel kasvava lihhenikoolse seene *Abrothallus* sp. ribosomaalse DNA ITS piirkonna amplifitseerimiseks.
- Praktilise osa teise etapi eesmärgiks on hinnata lihhenikoolse seene *Abrothallus* sp. esinemist islandi käokõrva tallustel, kasutades paralleelselt vaatlusi ja molekulaarseid meetodeid.

1. Lihhenikoolsed seened

Lihhenikoolsed seened on samblikega obligaatselt seotud seened, kes elavad saprotroofidena samblike surnud tallustel või kommensaalide või parasiitidena samblike elusatel tallustel (de los Ríos *et al.* 2002, Lawrey & Diederich 2003). Lihhenikoolseid seeni on kirjeldatud ligikaudu 1800 liiki umbes 300 seeneperekonnast, kuid hinnanguliselt võib neid olla üle 3000 liigi. Valdav enamus (üle 95%) kirjeldatud lihhenikoolsetest seentest on kottseened (*Ascomycota*), kandseente (*Basidiomycota*) hõimkonda kuulub alla 5% taksonitest ning umbes 20% lihhenikoolsete seente puhul on teada vaid nende anamorfne elujärk (Lawrey *et al.* 2012). Ligikaudu 95% lihhenikoolsetest seentest on peremees-spetsiifilised, s.t on seotud ühe samblikuperekonna või -liigiga (Lawrey & Diederich 2003).

Lihhenikoolsed seened parasiteerivad kas sambliku mükobiondil või fotobiondil. Harvem kasutab seen oma eluks mõlemat samblikusümbionti, kuid üht kasutatakse siiski esimesena. Paraku seda, kas seen parasiteerib müko- või fotobiondil, on teada vaid väheste liikide puhul (de los Ríos *et al.* 2002, Kotte 1909, Lawrey & Diederich 2003). Lihhenikoolsete seente suhe peremees-samblikega varieerub mitte-agressiivsetest ja kommensalistlikest vormidest kuni agressiivsete virulentsete vormideni (parasitism kitsas mõttes). Samblikele spetsialiseerunud saprotroofseid liike on vähe. Valdavalt on lihhenikoolsed seened biotroofid, vaid üksikud liigid on nekrotroofid. Nekrotroofsed liigid on kõrge virulentsusega ning surmavad oma elutegevuse tulemusena peremeesorganismi, seevastu biotroofid on madala virulentsusega, säilitavad oma peremehe elusana pikema aja jooksul ning ei tekita samblikule silmaga nähtavaid kahjustusi (Lawrey & Diederich 2003, Richardson 1999). Omaette rühmana võib käsitleda nn. pahkasid tekitavaid lihhenikoolseid seeni (ingl. k. *gall-forming fungi*), kes põhjustavad peremees-sambliku "kudede" vohamist, mille tõttu tekivad samblikutallusele selge morfoloogilise struktuuriga pahad. Samas võivad pahkade teket samblikel põhjustada ka teised organismid, näiteks lestad ja ümarussid (Lawrey & Diederich 2003).

2. Endolihhenikoolsed seened ja bakterid

Samblikutalluses võivad peale lihhenikoolsete seente elada ka endolihhenikoolsed seened (ingl. k. *endolichenic fungi*). Need seened ei kahjusta samblikutallust (s.t on mittepatogeensed), erinevalt lihhenikoolsetest seentest ei moodusta diaspoore (Honegger

2012) ning valdavalt on neid leitud samblikutalluse vetikakihist, harvem südamiku- ja koorkihist (Arnold *et al.* 2009). Samblikes ja sammaldes olevad endolihhenikoolsete seente kooslused kattuvad osaliselt, kuid samblikutallust ja sama kasvukoha taimi ning kõdu asustavad erinevad seeneliigid (väheste eranditega) (Arnold *et al.* 2009, U'Ren *et al.* 2010). Endolihhenikoolseid seeni on enim kottseente hõimkonna klassides *Pezizomycetes* ja *Sordariomycetes*, kuid neid leidub ka nn. teisseente (*Deuteromycetes*) hulgas (Li *et al.* 2007, U'Ren *et al.* 2010). Endolihhenikoolsus on kujunenud sambliku mükobiondi ja lihhenikoolsete seente evolutsioonist sõltumatult, s.t nendes kolme rühma kuuluvate seente vahel puuduvad põlvnemissuhted (U'Ren *et al.* 2010).

Samblikutalluse peal ja sees võib esineda ka fülogeneetiliselt mitmekesine bakterite kooslus (Grube *et al.* 2009b). Neist enim on leitud hõimkondade *Firmicutes*, aktinomütseedid (*Actinobacteria*) ja proteobakterid (*Proteobacteria*) esindajaid (Cardinale *et al.* 2006, Cardinale *et al.* 2012, Grube *et al.* 2009b). Bakterikooslused samblikes erinevad ümbritsevas keskkonnas olevatest kooslustest (Bates *et al.* 2011), ühtlasi on tallusesisesed kooslused tavaliselt spetsiifilisemad, kui talluse pinnal olevad (Grube *et al.* 2009b). Bakterite taksonoomilist koosseisu samblikes mõjutavad nii sambliku mükobiont kui fotobiont (Bates *et al.* 2011, Hodkinson *et al.* 2012), kuigi enamus baktereid samblikes elab kas mükobiondi peal või lähedal (Hodkinson *et al.* 2012). Samblikke asustavate bakterite roll pole üheselt teada, kuid mõned samblikega seotud bakterid võivad aidata samblikke teatud ainete vaeguse korral, nt. tootes kasvufaktoreid (Grube *et al.* 2009b) või sidudes õhus leiduvat lämmastikku (Bates *et al.* 2011, Grube *et al.* 2009b).

3. Uurimismeetodid

Samblikes elavate taksonite uurimiseks on kasutusel mitmeid peamiselt DNA järjestuste võrdlemisel põhinevaid või mikroskopeerimist nõudvaid meetodeid (Tabel 1). Osa meetoditest on rakendatavad nii lihhenikoolsete ja endolihhenikoolsete seente kui ka bakterite uurimiseks, kuigi mõne sellise meetodi rakenduspotentsiaal võib ühe rühma puhul olla suurem ning osa meetodeid on rühmaspetsiifilised.

Tabel 1. Enamkasutatavad meetodid lihhenikoolsete ja endolihhenikoolsete seente ning bakterite uurimiseks samblikes. "+" – meetodit on kasutatud vastava organismigrupi uurimisel, "-" – meetodit ei ole kasutatud vastava organismigrupi uurimisel.

Meetod		Lihhenikoolsed seened	Endolihhenikoolsed seened	Bakterid
Eluskultuuridel põhinevad	Eluskultuuride uurimine	+	+	+
	DNA eraldamine eluskultuuridest	+	+	+
Ei põhine eluskultuuridel	Mikroskopeerimine	+	-	+
	DNA eraldamine proovidest	+	+	+
	DNA sõrmejäljed	+	+	+
	Metaproteoomika	-	-	+
	DNA-raamatukogud	+	+	+

Lihhenikoolsete seente uuringud on siiani olnud indiviidi- või liigipõhised. Tavaliselt kirjeldatakse konkreetse sambliku sees või peal kasvava lihhenikoolse seene tunnuseid, eelkõige morfo-anatoomilisi ja füsioloogilisi tunnuseid, samblikele tekitatavaid kahjustusi jm. (Hawksworth & Miadlikowska 1997, Lawrey & Diederich 2003). Seevastu endolihhenikoolsete seente ja bakterite korral on uuringud enamasti koosluste põhised, s.t korraga vaadatakse kõiki ühes samblikus olevaid seeni või baktereid. Tihti ei määrata, või ei suudeta määrata, uuritavaid baktereid ja seeni liigi tasemeni, vaid piirduakse määramisega kõrgema taksonini (Arnold *et al.* 2009, Cardinale *et al.* 2012., Hodkinson *et al.* 2012, Peršoh & Rambold 2012).

Samblikes kasvavate bakterite, lihhenikoolsete ja endolihhenikoolsete seente uurimiseks on põhimõtteliselt kaks erinevat suunda – ühed meetodid eeldavad uuringute ühe etapina seente või bakterite kasvatamist eluskultuurina, teised mitte. Lihhenikoolsete seente söötmetel kasvatamist on kasutatud harva ning seenekultuuri eraldamine on õnnestunud valdavalt saprotroofsete seente puhul (Crittenden *et al.* 1995, Diederich *et al.* 2013, Lawrey & Diederich 2003). Endolihhenikoolsete seente ja bakterite söötmetel kasvatamist on kasutatud

sagedamini, kuid tavaliselt saadakse kätte ainult väike osa kogu taksonite mitmekesisusest, mis proovis tegelikult esineb. Tõenäoliselt vajavad mitmed seene- ja bakteriliigid kasvamiseks spetsiaalselt samblikes esinevat keskkonda, mida ei ole siiani suudetud eluskultuurides tagada (Grube & Berg 2009a).

Eluskultuuris mittekasvavate seene- ja bakteriliikide tuvastamiseks on kasutatud erinevaid mikroskopeerimise tehnikaid (heleväljamikroskoopia, transmissioon-elektronmikroskoopia (TEM), skaneeriv elektronmikroskoopia (SEM) jm.) (de los Ríos *et al.* 2002, Grube & Berg 2009a) või DNA-põhiseid meetodeid (Grube & Berg 2009a). Lihhenikoolsete seente puhul on erinevaid mikroskopeerimise tehnikaid kasutatud eelkõige taksonite kirjeldamiseks ja määramiseks (Grube & de los Ríos 2001, Lawrey & Diederich 2003), aga ka lihhenikoolse seene ja peremees-organismi vaheliste interaktsioonide (de los Ríos *et al.* 2002, Fahselt *et al.* 2001, Kotte 1909) ning lihhenikoolse seene ontogeneesi uurimiseks (Schaechtelin & Werner 1927).

Samblikes esinevate bakterite uurimiseks kasutatakse sageli fluorestsents *in situ* hübriidatsiooni (ingl. k. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) koos mikroskopeerimisega – epifluorestsents mikroskoopiaga (ingl. k. *epifluorescence microscopy*) või konfokaalse skaneeriva lasermikroskoopiaga (ingl. k. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM). Sellise kombineeritud meetodiga on uuritud bakterikoosluste koosseisu ja mitmekesisust samblikes (Cardinale *et al.* 2012, Pankratov 2012), paiknemist talluses (Grube *et al.* 2009b, Schneider *et al.* 2011) ning samblikes oleva kasvukeskkonna mõju mikroobikooslustele (Cardinale *et al.* 2012). Endolihhenikoolsete seente uurimiseks mikroskopeerimise erinevaid tehnikaid teadaolevalt kasutatud ei ole.

DNA-põhiste meetodite puhul on kasutatud eelkõige proovidest eraldatud DNA järjestuste võrdlemist geenipankades talletatavate DNA järjestustega. Lihhenikoolsete seente puhul on DNA-põhiste meetodite kasutamise eesmärgiks uuritavate seente fülogeneetilise asendi selgitamine seente süsteemis (Diederich *et al.* 2013, Lawrey *et al.* 2012) või geneetilise varieeruvuse hindamine lihhenikoolsete seente populatsioonides (Molina *et al.* 2005, Werth *et al.* 2013). DNA võidakse eraldada otse samblikest võetud proovidest (Muggia & Grube 2010) või puhaskultuuri viidud bakteritest ja seentest (Diederich *et al.* 2013, Lawrey *et al.* 2012, Peršoh & Rambold 2012). DNA-d otse samblikutalluse tükist eraldades on võimalik korraga kätte saada kõigi proovis olevate taksonite DNA ja seega uurida samblikes elavaid taksoneid kooslusena (Bates *et al.* 2011, Grube *et al.* 2012). Pürosekvenerimist on senini kasutatud

bakterikoosluste (Bates *et al.* 2011, Grube *et al.* 2012, Hodkinson *et al.* 2012, Mushegian *et al.* 2011) ja endolihhenikoolsete seente koosluste uurimiseks (U'Ren *et al.* 2014).

Üks võimalus tuvastamiseks kultuuris mittekasvavaid seeni ja baktereid on nn. DNA-sõrmejälgede meetodid (ingl. k. *fingerprinting*), mille käigus erineva nukleotiidsel järjestusega või erineva pikkusega DNA-lõigud eraldatakse geelelektroforeesil ning tulemuseks on iseloomulikud vööside mustrid. Ühtlasi on võimalik määrata saadud DNA-lõikude nukleotiidsel järjestus ning võrrelda neid geenipankades olevate järjestustega (Grube & Berg 2009a). Siia kuuluvad sellised meetodid nagu T-RFLP (Mushegian *et al.* 2011, Peterson *et al.* 2008), SSCP (Grube *et al.* 2009b, Muggia & Grube 2010), DGGE ja TGGE (Muyzer *et al.* 1993, Muyzer & Smalla 1998, Pérez-Ortega *et al.* 2011) ning RISA (Ranjard *et al.* 2000, Saag *et al.* 2012).

T-RFLP (ingl. k. *terminal restriction fragment length polymorphism*) analüüsis kasutatakse DNA amplifitseerimisel fluorestsentsmärgisega praimereid ja seejärel lõigatakse DNA-lõigud restriksiooniensüümidega kindla järjestuse kohalt fragmentideks, saadud fragmendid eraldatakse nende erineva pikkuse alusel (Mushegian *et al.* 2011, Peterson *et al.* 2008). SSCP (ingl. k. *single-strand conformation polymorphism*) meetodis denatureeritakse polümeraasi ahelreaktsiooni (ingl. k. *polymerase chain reaction*, PCR) produktid üheaahelalisteks DNA-lõikudeks ning need eraldatakse geelelektroforeesil ahelate erineva nukleotiidsel järjestuse põhjal (Grube *et al.* 2009b, Muggia & Grube 2010). DGGE (ingl. k. *denaturing gradient gel electrophoresis*) ja TGGE (ingl. k. *temperature gradient gel electrophoresis*) puhul eraldatakse geelil ühepikkused, kuid erineva nukleotiidsel järjestusega DNA fragmendid, kasutades vastavalt kas DNA-d denatureeriva aine või temperatuuri gradienti (Muyzer *et al.* 1993, Muyzer & Smalla 1998). DGGE meetodit on kasutatud lihhenikoolsete seente puhul näiteks teleomorf-anamorf seoste kindlaks tegemiseks (Pérez-Ortega *et al.* 2011).

Samblikes elavate lihhenikoolsete ja endolihhenikoolsete seente kindlaks tegemiseks on kasutatud ka DNA-raamatukogusid (ingl. k. *genomic library* või *clone library*). DNA-raamatukogu kujutab endast kogu organismi genoomi, mis on fragmentidena kloneeritud bakteritesse või faagidesse (bakterite viirused). Saadud kloonidest on võimalik amplifitseerida huvipakkuv DNA-lõik ning see sekveneerida. Võrreldes näiteks SSCP-meetodiga, võimaldavad DNA-raamatukogud saada uuritavatest organismidest pikemaid DNA-fragmente, mis on vajalikud fülogeneesi uurimiseks (Muggia & Grube 2010). Samuti on

kasutatud DNA-raamatukogusid, et uurida geograafilisi ning mükobiondi ja fotobiondi mõjusid samblikes olevatele bakteritele (Hodkinson *et al.* 2012).

Metaproteoomika (ingl. k. *metaproteomics*) tähendab kindla koosluse kõikide genoomilt ekspresseeritud valkude kirjeldamist mingil konkreetsel ajahetkel konkreetses kasvutingimustes. Kuna valgud kajastavad ainevahetuslike protsesside ja reguleerivate kaskaadide tegelikke aktiivsusi rakus, siis on võimalik saada elusorganismide, sh bakterite, elutegevusest täpsemat informatsiooni, kui seda on võimalik saada funktsionaalsete geenide ja neile vastavate mRNA järjestuste põhjal (Keller & Hettich 2009). Metaproteoomikaga on analüüsitud samblikes olevate bakterikoosluste struktuuri ja funktsiooni (Schneider *et al.* 2011).

4. Materjal ja metoodika

Tööks vajamineva materjali kogus töö autor koos juhendajaga ning kõik praktilised tööd teostas töö autor.

4.1. Uuritavad liigid

Käesoleva töö objektideks on perekonda *Abrothallus* De Not. (*Abrothallaceae*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*) kuuluv liigini määramata lihhenikoolne seen ning tema peremees-samblik islandi käokõrv (*Cetraria islandica* (L.) Ach., *Parmeliaceae*, *Lecanoromycetes*, *Ascomycota*).

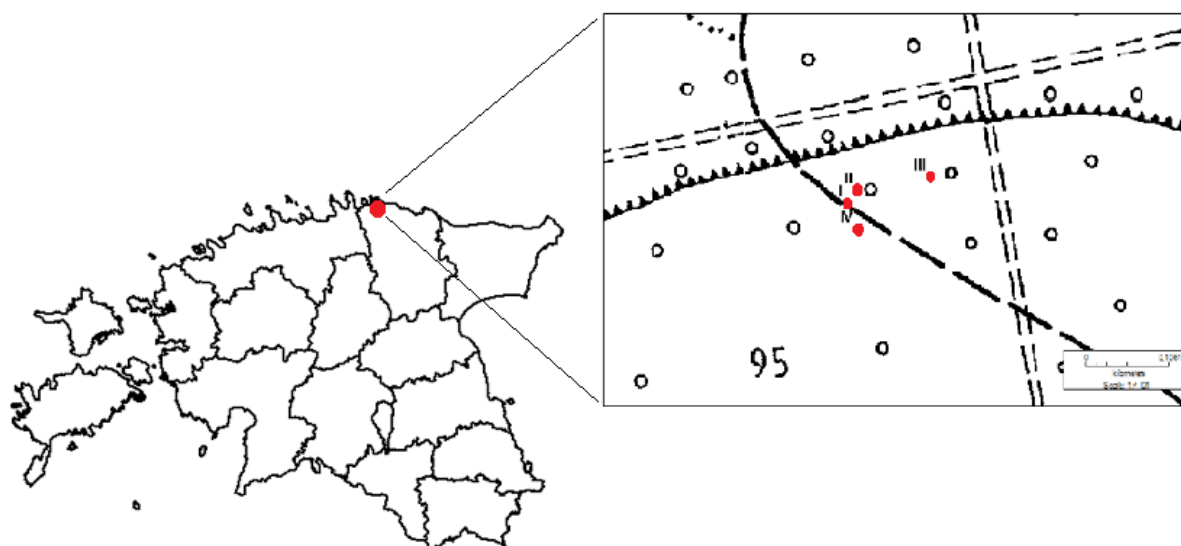
Perekonda *Abrothallus* kuuluvad seened on obligaatselt samblikega seotud seened. Praeguseks on perekonnas kirjeldatud 23 liiki (<http://www.indexfungorum.org>), neist kuus on leitud ka Eestist (Randlane & Saag 2004). Perekonna iseloomulikeks tunnusteks on kumerad kuni peaaegu kerajad apoteetsiumilaadsed viljakehad, mis on sageli kaetud tiheda rohelise härmakihiga; eoskotid on bitunikaatsed ja sisaldavad tavaliselt kaheksat pruuni, asümmeetrilist, 2-, 3- või 4-rakulist näsalise pinnaga kotteost, mis mõnel liigil jagunevad juba eoskotis osa-spoorideks (Diederich 2004, Pérez-Ortega *et al.* 2014). Seene anamorfnel järk on püknidiaalne (anamorf perekond *Vouauxiomyces*) ning võib areneda samblikutallusel samaaegselt koos teleomorfiga (Hawksworth 1981, Pérez-Ortega *et al.* 2011). Sellesse perekonda kuuluvad liigid kasvavad kas kommensaali või parasiidina paljudel lehtja ja põõsasja tallusega samblikel (Randlane & Saag 2004), mis valdavalt kuuluvad sugukondadesse *Parmeliaceae*, *Cladoniaceae*, *Ramalinaceae* ja seltsi *Peltigerales* (Pérez-Ortega *et al.* 2014). Eelkõige sugukonna *Parmeliaceae* esindajatel kasvavate perekonna *Abrothallus* taksonite puhul on probleem liikide piiritlemises, kuna selle rühma morfoanatomiliste tunnuste (eoste ja viljakehade suurus jm.) varieeruvus ületab uuritud geneetiliste markerite varieeruvuse (Suija *et al.* 2008, Pérez-Ortega *et al.* 2014).

Islandi käokõrv on halli kuni pruuni põõsasja tallusega, 3...6(12) cm kõrgune, maapinnal kasvav samblik. Talluse ülapiiril on tavaliselt läikiv ning alapoolel paiknevad pseudotsüfelligid. Islandi käokõrv võib paljuneda kolmel viisil: vegetatiivselt tallusetükikestega, mitosporidega (koniididega) või meiosporidega (askosporidega). Sambliku tumepruunid apoteetsiumid paiknevad talluse laiienenud hõlmatippudes ning esinevad suhteliselt harva. Sambliku fotobiondiks on perekonda *Trebouxia* (*Chlorophyta*) kuuluv üherakuline vetikas. Islandi

käokõrv kasvab nõmmemetsades, nõmmedel ja liivikutel ning on Eestis tavaline (Trass & Randlane 1994).

4.2. Materjali kogumine

Käesoleva töö lähtematerjal koguti Lahemaa rahvuspargist, Lääne-Viru maakonnast Vihula vallast Tepelvälja külast (ala keskpunkt 59°33'57"N, 26°02'14"E) (Joonis 1). Proovid võeti sambliku-pohla kasvukohatüübi männikust, kust varasemast oli teada islandi käokõrva ulatuslik nakatumine perekonda *Abrothallus* kuuluva seenega (Suija, suulised andmed).



Joonis 1. Prooviala paiknemine Lahemaa rahvuspargis ning transektide I-IV paiknemine proovialal.

Materjali kogumiseks moodustati proovialal neli transekti (I-IV) (Joonis 1). Iga transekti puhul valiti keskpunktiks lihhenikoolse seenega nakatunud islandi käokõrva tallus, millest neljas suunas (põhi, lõuna, ida, lääs) piki transekti (k.a. keskpunktist) koguti iga 10 cm järel kaasa islandi käokõrva tallus. Kui islandi käokõrv transekti järgmise punkti juures puudus, siis mõõdeti sellest kohast 10 cm edasi. Esimeselt transektilt võeti kaasa 50, teiselt 44, kolmandalt 20 ja neljandalt 35 proovi. Kõigi nelja transekti materjali puhul vaadeldi talluseid stereomikroskoobi all, et kindlaks teha lihhenikoolse seene viljakehade esinemist. Neljanda transekti materjali puhul kasutati lisaks molekulaarseid meetodeid, et selgitada, kas vaatlusandmed kattuvad molekulaarsete andmetega. Neljanda transekti materjal valiti molekulaarseks analüüsiks juhuslikult.

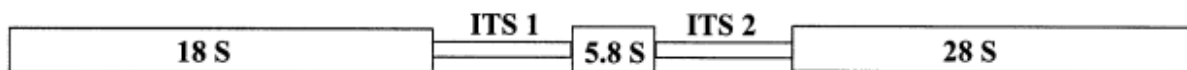
4.3. Proovide ettevalmistamine molekulaarseks analüüsiks

Molekulaarseks analüüsiks valiti neljanda transekti materjal – 35 tallust. Iga tallus jaotati silma järgi kolmeks osaks – tipmiseks, keskmiseks, alumiseks – ning igast osast lõigati skalpelliga *ca* 4 mm² suurune tükk. Alumistest talluseosadest proovide võtmisel ei kasutatud surnud talluseosi, kuna eeldati, et need võivad sisaldada mullast pärinevaid või surnud talluseosi lagundavaid seeni. Proovi puhastamiseks võimalikest sambliku pinnal olevatest organismidest asetati tallusetükk üheks minutiks 96% etanoolilahusesse, seejärel loputati kaks korda destilleeritud veega ning asetati 1,5 ml Eppendorfi tuubi. Tallusetükkidest DNA eraldamiseks kasutati High Pure PCR Template Preparation Kit'i (Roche Applied Science, Mannheim, Saksamaa).

DNA eraldamisel järgiti tootjapoolset protokollit järgnevate muudatustega:

- tallusetükkide purustamiseks pandi pärast lüüsi- ja sidumispuhvreid (ingl. k. *tissue lysis buffer*) lisamist igasse tuubi kaks metallist kuulikest ning tuube raputati 1,5 minutit sagedusel 30 Hz,
- tootja ettenähtud 200 µl asemel kasutati 190 µl lüüsi- ja 190 µl sidumispuhvreid (ingl.k. *binding buffer*) ning
- 500 µl asemel kasutati 450 µl inhibiitori eemalduspuhvreid (ingl. k. *inhibitor removal buffer*) ja 450 µl pesupuhvreid (ingl. k. *wash buffer*),
- eraldatud DNA elueeriti 100 µl elueerimispuhvril (ingl. k. *elution buffer*) (200 µl asemel).

Eraldatud DNA lahust kasutati ribosomaalse DNA (rDNA) ITS piirkonna (ingl. k. *internal transcribed spacer*) järjestuse amplifitseerimiseks polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodil. rDNA ITS regioon koosneb kahest varieeruvast mittekodeerivast alast (ITS1 ja ITS2), mis paiknevad rDNA järjestuse sees ribosoomi väikese alaühiku (18S), 5.8S ja ribosoomi suure alaühiku (28S) konserveerunud piirkondade vahel (Joonis 2). Seente puhul jääb terve ITS piirkond tavaliselt 600 ja 800 aluspaari vahele (Gardes & Bruns 1993). See DNA regioon evolutsioneerub suhteliselt kiiresti ja tänu sellele sobib seente liikide ja perekondade DNA-põhiseks määramiseks (DNA triipkoodiks) (Prewitt *et al.* 2008, Schoch *et al.* 2012). Kuna ribosoomi kodeerivad geenid esinevad genoomis suure korduste arvuga, on ITS regiooni lihtne amplifitseerida ka väga väikestest, lahjendatud või lagunenenud DNA proovidest (Gardes & Bruns 1993) ning selle regiooni kohta on geenipankades palju võrdlusmaterjali (Arnold *et al.* 2007).



Joonis 2. Eukarüootide rDNA piirkonna skeem. 18S, 5.8S ja 28S on ribosoomi kodeerivad geenid, nende vahele jäävad mittekodeerivad ITS1 ja ITS2 piirkonnad (Larena *et al.* 1999, muudetud).

4.4. Praimerite disain

Segaproovidest kindla taksoni DNA-järjestuse kättesaamiseks on soovitatav kasutada taksoni-spetsiifilisi primereid (Larena *et al.* 1999, Tedersoo *et al.* 2008). Praimerite disainimisel kehtivad järgmised põhimõtted (Innis & Gelfand 1990):

- 1) praimer peaks olema 18...28 aluspaari pikk;
- 2) 50...60% alustest peaks olema G ja C;
- 3) praimer võiks lõppeda G või C alusega;
- 4) praimeri sulamistemperatuur (T_m) võiks olla vahemikus 55...80 °C;
- 5) päri- ja vastassuunalise praimeri T_m -id võiksid olla sarnased (erinevus kuni 5 °C);
- 6) tuleks vältida kolme või enam järjestikust G või C alust praimeri 3' otsas;
- 7) praimerite 3' otsad ei tohiks olla komplementaarsed;
- 8) tuleks vältida praimerite iseendaga seondumist.

Praimerite järjestused peavad olema piisavalt pikad selleks, et praimerid amplifitseeriks kindla organismi konkreetset DNA lõiku ning seonduks ainult ühe märklaud-DNA (ingl. k. *target DNA*) piirkonnaga. Pikematel praimeritel kulub märklaud-DNA-ga seandumiseks rohkem aega ning nende sulamistemperatuur (T_m) on kõrgem (Dieffenbach *et al.* 1993). G või C alus praimeri lõpus suurendab märklaud-järjestusega seandumise tõhusust, samas kolm ja enam järjestikust G või C alust praimeri 3' otsas võib soodustada valesti paardumist juhul, kui sekventsides on suur G või C aluste osakaal. Praimerite 3' otsad ei tohiks olla komplementaarsed, sest see suurendab praimerite omavahelise seandumise tõenäosust ja vähendab seetõttu soovitava produkti hulka. Samuti vähendab PCR-i produkti hulka praimeri seondumine iseendaga, mis võib tekitada nn. juuksenõela struktuure (ingl. k. *hairpin structure*) (Innis & Gelfand 1990, Dieffenbach *et al.* 1993).

Perekonna *Abrothallus* spetsiifiliste praimerite disainimise aluseks oli 24 rDNA ITS piirkonna sekvensi, mis hõlmasid ribosoomi väikese alaühiku lõpuosa, ITS1, 5.8S, ITS2 regioone ja ribosoomi suure alaühiku algusosa (Joonis 2). Kasutatud sekventsides geneetiline varieeruvus

oli kuni 3% ning sekventsise omapäraks oli kõrge G ja C aluste sisaldus (58...60%), mis raskendas spetsiifiliste praimerite leidmist. Sobivate praimeripaaride leidmiseks kasutati programmi GeneFisher (Giegerich *et al.* 1996) veebiversiooni (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>) ning programmi BioEdit (Hall 1999). Praimerite omaduste kontrollimiseks kasutati programmi OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Sobivate praimerite leidmiseks programmile GeneFisher etteantud esialgsed tingimused olid järgmised:

praimeri pikkus 18...27 aluspaari,
G ja C aluseid 40...60%,
T_m 52...60 °C,
3' otsa G ja C aluste osakaal 45...55% ning
praimeri viimane alus kas A, T, G või C.

Programmi pakutud kaheksa praimeripaari seast jäeti kõrvale need, millede T_m-de vahe oli suurem kui 4 °C ning praimerid, mis seonduvad endaga nelja või enama järjestikuse aluspaari ulatuses. Programmi pakutud paaridest valiti välja vastasuunaline praimer ABR, millele leiti manuaalselt – programmi BioEdit abil – pärisuunaline paariline ABF (Joonis 4, Tabel 2). Praimerite töökindluse testimiseks võrreldi neid BLAST (ingl. k. *basic local alignment search tool*) algoritmi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul *et al.* 1990) abil geenipangas olevate DNA järjestustega, samuti võrreldi neid järjestusi teiste laialdaselt kasutatavate praimerite järjestustega (ITS1, ITS5, ITS2, ITS4 (White *et al.* 1990), ITS1F, ITS4B (Gardes & Bruns 1993), ITS0F (Tedersoo *et al.* 2008)). Praimerite töökindluse testimiseks kasutati kuuest proovist eraldatud DNA-segu tähistusega 28...33. Lisaks nendele kasutati võrdluseks islandi käokõrvaga samasse sugukonda (*Parmeliaceae*) kuuluva sambliku *Parmelia serrana* mükobiondi ning *Abrothallus* spp. DNA-proove (Lisa 1), et hinnata praimerite ABF ja ABR spetsiifilisust. Kuna selgus, et nimetatud praimeripaar ei paljundanud ainult *Abrothallus* spp. DNA-d, siis lõdvendati praimeritele esitatavaid nõudeid erinevates kombinatsioonides kuni järgmiste tingimusteni:

praimeri pikkus 17...27 aluspaari,
G ja C aluseid 20...80%,
T_m 45...65 °C,
3' otsa G ja C aluste osakaal 0...100%,
praimeri viimane alus A, T, G või C.

Selliste lõdvendatud tingimuste eesmärgiks oli leida kas või mõni üsna kehvade tunnustega praimer, mida oleks saanud hiljem korrigeerida, toetudes etteantud sekventsile. Tulemuseks saadi pärisuunaline praimer AB1F (Joonis 4, Tabel 2), mida katsetati koos vastassuunalise praimeriga ABR-ga. Nende praimerite testimisel kasutati võrdluseks islandi käokõrva ja *Parmelia serrana* mükobiontide DNA-d ning lihhenikoolsete seente *Unguiculariopsis lettaui* (*Helotiales*, *Leotiomyces*) ja *Abrothallus* spp. DNA-d (Lisa 1).

Tabel 2. Disainitud praimerid, nende nukleotiidsed järjestused ja sulamistemperatuurid (T_m).

Praimeri nimi	Järjestus (5'...3' suunas)	T _m (°C)
ABF	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	58,4
AB1F	GGT GAA CCT GCG GAA GGA T	59,5
ABR	TGA AAT GAC GCT CGG ACA G	57,5
AB-734r	TAA CAA CTC ACC TGC CGA ATG	59,5
AB-R310	GTT GAA ATG ACG CTC GGA C	57,5

Programmiga GeneFisher leiti vastassuunaline praimer AB-734r (Tabel 2), mida katsetati koos ABF-ga. Nende testimisel kasutati lisaks islandi käokõrvast eraldatud DNA-d (Lisa 1). Neljandaks katsetatud praimerite paariks oli ABF ja AB-R310 (Tabel 2), milledest mõlemad leiti programmi BioEdit abil. Võrdlusmaterjalina kasutati islandi käokõrva ja *Parmelia serrana* mükobiontide ning lihhenikoolsete seente *Nectriopsis lecanodes* (*Hypocreales*, *Sordariomyces*), *Unguiculariopsis lettaui* ja *Abrothallus* spp. DNA-d (Lisa 1).

PCR viidi läbi 25 µl reaktsioonisegus, mille koostis oli järgmine:

- 5 µl PCR-i segu (5x HOT FIREPol Blend Master Mix, Solis BioDyne, Tartu, Eesti),
- 0,5 µl päri- ja vastassuunalist praimerit,
- 17 µl destilleeritud vett,
- 2 µl märklaud-DNA-d.

Proovid amplifitseeriti termotsükleris vastavalt programmile

- 1) algne denaturatsioon 95 °C juures 15 minutit;
- 2) denaturatsioon 95 °C juures 1 minut;
- 3) praimerite seondumine 57 või 58 °C juures 2 minutit;

- 4) ahelate pikendamine 72 °C juures 2 minutit;
- 5) etappe 2...4 korratakse 35 korda;
- 6) lõplik DNA ahelate pikendamine 72 °C juures 10 minutit.

Saadud PCR-i produktide kontrollimiseks kanti proovid 1% agarosgeelile, millel DNA visualiseeriti etiidiumbromiidiga ning geeli voolutati 100 V pinges juures 25...30 minutit.

4.5. Lihhenikoolse seene määramine islandi käokõrva tallustest

Töö järgmise etapina kasutati ribosomaalse geenidevahelise speisserjärjestuse analüüsi (ingl. k. *rRNA intergenic spacer analysis*, RISA), et teha kindlaks seene *Abrothallus* sp. olemasolu islandi käokõrva talluse eri osades. RISA meetodi puhul amplifitseeritakse DNA-seguproovist nende taksonite DNA, millega seonduvad kasutatavad praimerid. Saadud PCR-i produktid lahutatakse geelelektroforeesil ning saadakse vöötide muster, mille puhul eeldatakse, et ühel geelirajal olevad vöödid vastavad erinevatele DNA-segus olevatele organismidele (Ranjard *et al.* 2000, Saag *et al.* 2012). Neid vööte on võimalik geelist välja lõigata ning neis sisalduv DNA puhastada ja seejärel sekveneerida.

Käesolevas töös kasutati molekulaarseks analüüsiks 105 DNA-seguproovi, mis saadi 35 samblikutallusest, igast tallusest kolm DNA-proovi (tipust, keskelt, alt). Proovidest eraldatud DNA amplifitseeriti, kasutades erinevaid praimerite paare (ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS0F/AB-R310; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4; ITS1F/ITS4) (Lisa 2). Erinevaid praimerite kombinatsioone kasutati selleks, et välja selgitada, millised töötavad kõige paremini. PCR-i reaktsioonisegus oli 5 µl DNA-d ning amplifitseerimisel kasutati praimerite töökindluse testimisel kasutatud tsüklit (ptk. 4.4.) välja arvatud, et denaturatsiooniaeg oli 30 sekundit, praimerite seondumine toimus 30 sekundi jooksul 55 °C juures ning ahelate pikendamise aeg oli üks minut.

Saadud PCR-i produktid lahutati 1,5% agarosgeelil voolutusajaga 2 tundi. Seitsmendat RISA geeli (1,5%) voolutati 1 h 30 min. Kaheksanda ja kümnenda RISA puhul kasutati 2% agarosgeeli, millel voolutati proove 1 h 15 min. Üheksanda RISA puhul kasutati 2,5% agarosgeeli voolutusajaga 1 h 15 min ning 11. RISA jaoks tehti 2,5% geel, mida voolutati 2 h. Erinevaid geelitihedusi ja voolutusaegu katsetati selleks, et välja selgitada, kas see avaldab mõju DNA-vöötide lahutuvusele geelil. Järgnevalt lõigati RISA geelilt välja DNA-d sisaldavad geelitükid ning need pandi 1,5 ml Eppendorfi tuubidesse, kuhu lisati 200 µl

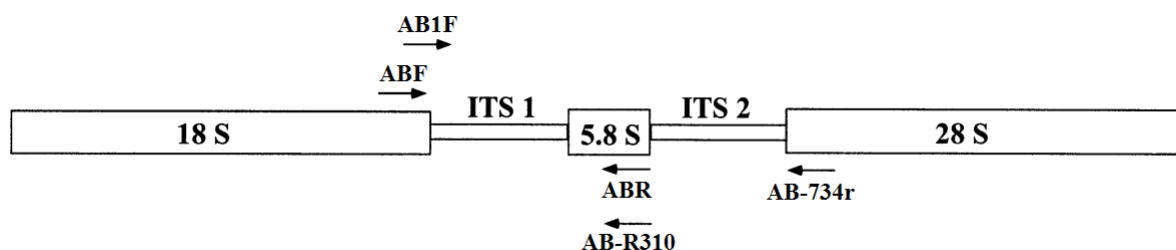
destilleeritud vett, segati, fuugiti 14 000 rpm juures kolm minutit ning seejärel hoiti proove umbes ööpäev 4 °C juures. Järgmisel päeval fuugiti proove minut aega 14 000 rpm ning segati. Saadud lahuse põhjal tehti uus PCR eelpool kirjeldatud meetodil, kasutades 10 µl DNA-lahust. PCR-i õnnestumist kontrolliti 1% agarosgeelil, millel DNA visualiseeriti etiidiumbromiidiga ning geeli voolutati 100 V pinge juures 25...30 minutit.

PCR-i reaktsioonisegude puhastamiseks lisati igale proovile 1 µl ensüümi FastAP ning 0,5 µl ensüümi Exonuclease I (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Proovid asetati termotsüklerisse, kus need olid 45 minutit 37 °C juures (ensüümide töötamine) ning seejärel 15 minutit 85 °C juures (ensüümide denatureerimine). Puhastatud DNA proovid sekveneeriti firmas Macrogen Inc. (Lõuna-Korea) või Eesti Biokeskuses. 35 talluseproovist saadud 105 DNA-segu kasutati RISA-s üks või mitu korda vastavalt sellele, kas amplifitseerimine, reamplifitseerimine ning sekveneerimine õnnestusid. Sekveneerimiseks valiti DNA-proovid, mille puhul saadi geelirajal üks selge vööt. Saadud sekventsitude konsensusjärjestuste leidmiseks ja nende järeltöötlemiseks kasutati programmi Sequencher 5.1. (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA). Sekventse võrreldi geenipangas olevate geenijärjestustega kasutades selleks BLAST algoritmi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul *et al.* 1990).

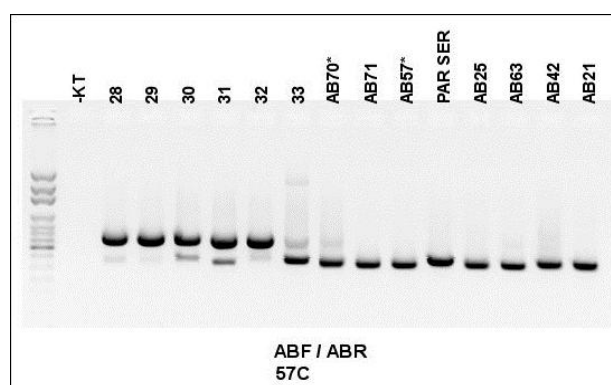
5. Tulemused

5.1. Disainitud praimerid

Esimene laboris katsetatud praimerite paar oli ABF/ABR (Joonised 3 ja 4, Tabel 2), mille amplifitseeritav lõik on umbes 350 aluspaari ning hõlmab ribosoomi väikese alaühiku (18S) lõpu, ITS1 ning 5.8S piirkonna. Pärisuunaline praimer ABF on nukleotiidse järjestuse poolest identne praimeriga ITS5 (White *et al.* 1990). DNA-segudest 28...32 saadud geeliradadel oli kõigil kaks vööti, proovist 33 oli amplifitseerunud kolm DNA-lõiku (geelil oli kolm vööti). Ühtlasi oli ühest *Abrothallus* sp. DNA-proovist (AB70*) amplifitseerunud kaks DNA lõiku ning praimeripaar ABF/ABR amplifitseeris ka sambliku *Parmelia serrana* mükobiondi DNA-d. Seega ei osutunud kasutatud praimerid piisavalt spetsiifilisteks (Joonis 4).



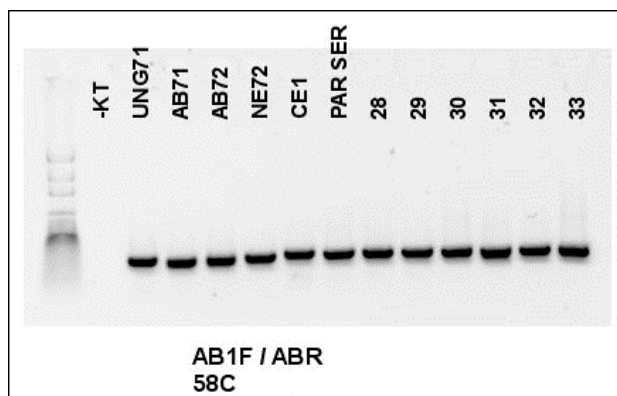
Joonis 3. Laboris katsetatud praimerite ligikaudsed seandumiskohad rDNA piirkonnas. 18S, 5.8S ja 28S on ribosoomi kodeerivad geenid, nende vahele jäävad mittekodeerivad ITS1 ja ITS2 piirkonnad (Larena *et al.* 1999, muudetud).



Joonis 4. Praimerite ABF/ABR geelipilt. Numbrid 28...33 tähistavad samblikest eraldatud DNA-segusid. AB70*, AB71, AB57*, AB25, AB63, AB42 ja AB21 on perekonna *Abrothallus* (*Abrothallales*, *Dothideomycetes*) DNA-proovid, PAR SER – *Parmelia serrana* (*Lecanorales*, *Lecanoromycetes*) DNA-proov ning –KT on kontroll.

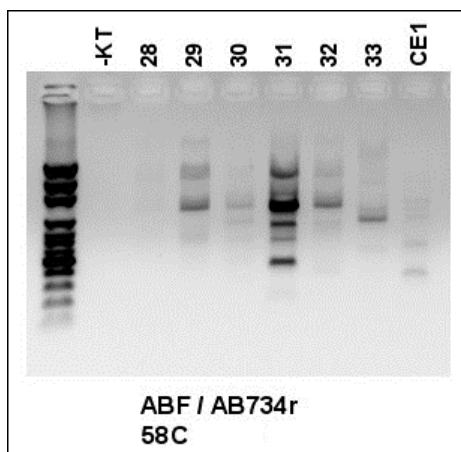
Järgmisena katsetati primereid AB1F ja ABR (Joonis 3, Tabel 2), nende vahele jääv lõik on ligikaudu 300 aluspaari ning sisaldab ITS1 ja 5.8S piirkonda. Ka selle praimerite paari

(AB1F/ABR) puhul selgus, et see amplifitseerib samblike mükobiontide DNA-d, sh islandi käokõrva DNA-d (Joonis 5) ning seetõttu ei saa neid primereid kasutada spetsiifiliselt perekonna *Abrothallus* DNA eraldamiseks DNA-segust. Samas on praimeripaaril AB1F/ABR ilmselt suurem spetsiifilisus võrreldes praimeripaariga ABF/ABR, kuna kõigist proovidest on amplifitseeritud vaid ühte DNA lõiku (geelil oli üks vöö). Ka selliste proovide puhul, kus oli eelnevalt teada vähemalt kahe seene – islandi käokõrva mükobiondi ja *Abrothallus* sp. – olemasolu ning geelirajal võiks eeldada vähemalt kahte vööti, oli üks selge vöö.



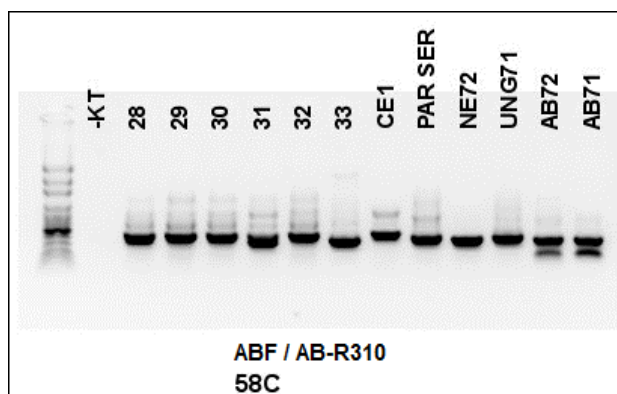
Joonis 5. Praimerite AB1F/ABR geelipilt. 28...33 – samblikest eraldatud DNA-segud, UNG71 – *Unguiculariopsis lettai* (*Helotiales*, *Leotiomyces*), AB71 ja AB72 – *Abrothallus* spp. (*Abrothallales*, *Dothideomycetes*), NE72 – *Nectriopsis lecanodes* (*Hypocreales*, *Sordariomycetes*), CE1 – *Cetraria islandica* (*Lecanorales*, *Lecanoromycetes*), PAR SER – *Parmelia serrana* (*Lecanorales*, *Lecanoromycetes*), –KT – kontroll.

Kolmandaks katsetati primereid ABF ja AB-734r (Joonis 3, Tabel 2), mis amplifitseerivad umbes 730 aluspaari pikkuse DNA-lõigu. Paljundatav ala on rDNA väikese alaühiku (18S) lõpust kuni suure alaühiku (28S) alguseni. Nimetatud praimeripaar osutus kõige ebatöökindlamaks, sest amplifitseeris potentsiaalselt kõikide proovis olevate taksonite DNA-d (Joonis 6). Amplifitseeritud DNA-lõigud olid erineva pikkusega (paiknesid geelil erineval kõrgusel), mis võib viidata sellele, et antud primereid seonduvad märklaud-DNA-l enam kui ühte kohta (Joonis 6).



Joonis 6. Praimerite ABF/AB-734r geelipilt. 28...33 – samlikest eraldatud DNA-segud, CE1 – *Cetraria islandica* (*Lecanorales*, *Lecanoromycetes*) DNA-proov, –KT – kontroll.

Viimasena katsetatud praimerite paar oli ABF/AB-R310 (Joonis 3, Tabel 2), mille paljundatav lõik on ligikaudu 300 aluspaari ning hõlmab ribosoomi väikese alaühiku lõpu, ITS1 ning 5.8S piirkonna. Vastassuunaline praimer AB-R310 on peaaegu sama järjestusega kui praimer ABR, kuid algab sellest kaks aluspaari varem. Ka seda praimeripaari ei saa kasutada DNA-segust spetsiifiliselt *Abrothallus* sp. DNA eraldamiseks, sest see amplifitseerib erinevate proovis olevate organismide DNA-d ja/või seondub märklaud DNA-l rohkem kui ühte kohta, millele viitab topeltvööte teke proovidel CE1, PAR SER, AB71 ning AB72 (Joonis 7).



Joonis 7. Praimerite ABF/AB-R310 geelipilt. 28...33 – samlikest eraldatud DNA-segud, CE1 – *Cetraria islandica* (*Lecanorales*, *Lecanoromycetes*), PAR SER – *Parmelia serrana* (*Lecanorales*, *Lecanoromycetes*), NE72 – *Nectriopsis lecanodes* (*Hypocreales*, *Sordariomycetes*), UNG71 – *Unguiculariopsis lettai* (*Helotiales*, *Leotiomycetes*), AB71 ja AB72 – *Abrothallus* spp. (*Abrothallales*, *Dothideomycetes*), –KT – kontroll.

5.2. *Abrothallus* sp. islandi käokõrva tallustes

5.2.1. RISA ja sekveneerimise tulemused

RISA meetoodika kasutamise eesmärgiks oli määrata lihhenikoolse seene *Abrothallus* sp. olemasolu islandi käokõrva talluse eri osades. Kasutatud 105 DNA-segu vastavad 197-le RISA geelirajale 13 geelil (üks rada vastab ühele nõ. hambale geelil) (Lisa 3). 197 geelirajast 85 rajal oli kaks või kolm DNA vööri (nende 85 raja puhul kasutati 28 proovi jaoks DNA-segu, mis saadi talluseosast, kus olid seene *Abrothallus* sp. viljakehad) ja 112 rajal oli üks vööt (neist 112 rajast 13 puhul kasutati DNA-segu, mis saadi talluseosast, kus olid seene *Abrothallus* sp. viljakehad) (Tabel 3). 197 rajast 41 puhul kasutati DNA-segu, mis saadi sellisest talluseosast, kus olid seene *Abrothallus* sp. viljakehad. Nendest 41 rajast omakorda 28 geelirajal oli kaks või kolm vööri. Samblikutalluse ala- ja keskosast eraldatud proovidest saadud RISA geeliradade puhul oli lihhenikoolse seene viljakehadega talluseosadest saadud DNA-segusid vähem, kui saadi vastavate talluseosade puhul mitme vöödiga geeliradasid (Tabel 3). Talluse tipuosadest eraldatud DNA-segude puhul olid 19 kasutatud talluseosal seene *Abrothallus* sp. viljakehad, kuid mitme vöödiga radu saadi talluse tipuosadest eraldatud DNA-segudest 16 korral.

Tabel 3. RISA koondtabel (13 RISA geeli andmed). Kokku – geeliradade arv kokku. Alaosa, keskosa, tipuosa näitab geeliradade arvu, mille jaoks kasutati samblikutalluse vastavast osast võetud DNA-segu. Üks vööt/kaks või kolm vööri – geeliradade arv, millel oli vastav arv vööte. Viljakehade esinemine – DNA-segude arv, mis olid võetud sellisest talluseosast, kus olid seene *Abrothallus* sp. viljakehad.

	Kokku	Alaosa	Keskosa	Tipuosa
	197	72	66	59
Üks vööt	112 (57%)	35 (49%)	34 (52%)	43 (73%)
Kaks või kolm vööri	85 (43%)	37 (51%)	32 (48%)	16 (27%)
Viljakehade esinemine	41 (21%)	3 (4%)	19 (29%)	19 (32%)

Alumistest talluseproovidest saadi 72 RISA geelirada ning nende hulgas kasutati kolmel korral sellist talluseosa, kus olid *Abrothallus* sp. viljakehad (Tabel 3). Nendest kolmest DNA-

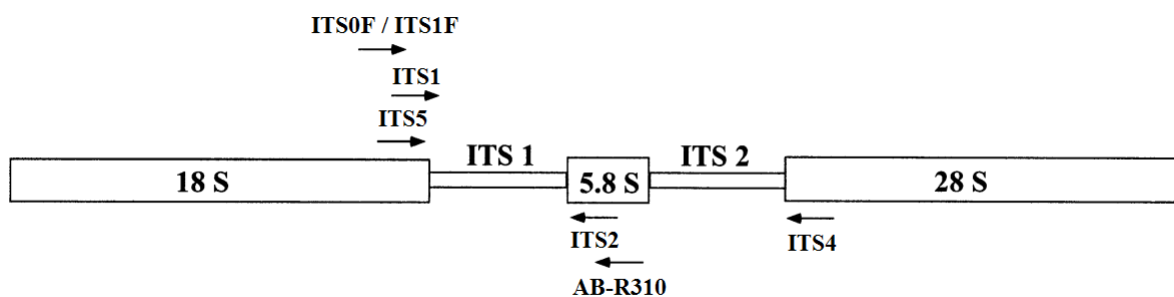
segust kahe puhul saadi RISA geelil kolm DNA-vööti. Keskmistest talluseosadest saadud geeliradade jaoks (kokku 66) 19 puhul kasutati talluseosa, kus olid *Abrothallus* sp. viljakehad (Tabel 3), neist 19 korrast omakorda 14 geelirajal (74%) oli mitu vööti. Tipmistest talluseosadest saadud geeliradade (kokku 59) jaoks kasutati 19 korral talluseosa, kus olid *Abrothallus* sp. viljakehad (Tabel 3), neist 19 korrast omakorda 12 geelirajal (63%) saadi RISA geelil mitu vööti. S.t kui kasutati lihhenikoolse seene viljakehadega talluseosadest eraldatud DNA-d, siis minimaalselt 63% kordadest saadi RISA geelil mitu vööti.

Kõigi amplifitseerimiste ja reamplifitseerimiste peale kokku saadeti sekveneerimisele 167 DNA-proovi, milledest 130 proovi (78% saadetud proovide) puhul saadi DNA konsensusjärjestus (Lisa 3). RISA geeliradasid oli 197 ning otse RISA geelilt saadeti sekveneerimisele 62 proovi. Nendest 62-st proovist tuli välja 61, s.t saadi 61 sekventsi. 105 proovi saadeti sekveneerimisele pärast reamplifitseerimist ning nendest 105 proovist 69 puhul saadi sekvents. 35 DNA-segu olid sellised, mille kohta saadeti mitu proovi sekveneerimisele ning nende DNA-segude peale kokku saadeti sekveneerimisele 98 proovi, milledest saadi 66 sekventsi. 69 DNA-segu olid sellised, mille kohta saadeti sekveneerimisele ainult üks DNA-proov ning nendest omakorda saadi 64 sekventsi.

Üheteistkümmel korral saadi ühe geeliraja mõlema vöödi kohta sekvents, neist seitsmel korral saadi mõlema vöödi tulemuseks *Abrothallus* sp. (Lisa 3). Kuna üldiselt on *Abrothallus* spp. DNA järjestused väga vähe varieeruvad, siis võib tegu olla proovide saastumisega geelist DNA-vöötidest väljalõikamisel. Samas ilmnes praimerite disainimise etapis, et praimer AB-R310 võib seonduda rohkem kui ühte kohta märklaud DNA-l (Joonis 7), s.t tegu ei pruukinud olla saastusega, vaid mõlemad saadud vöödid võisidki kuuluda seenele *Abrothallus* sp. Neljal korral saadi ühe geeliraja erinevatest vöötidest erinev organism (islandi käokõrv ja *Abrothallus* sp., *Trichophyton rubrum* või *Hyaloscyphaceae*). Kahel korral saadi samast RISA geeli vöödist (sekveneerimisele saadeti proovid erinevatelt RISA geelidelt) erinev organism (*Abrothallus* sp. ja *Penicillium* sp.; *Antrodia serialis* ja islandi käokõrv). Kokku tuvastati seene *Abrothallus* sp. olemasolu 25-st erinevast DNA-segust, milledest 18 puhul saadi RISA geelil mitu vööti (Lisa 3).

5.2.2. Praimerid ja geelitihedused

RISA-s katsetati kahte DNA amplifitseerimise varianti: 1. RISA-s ja hilisemal reamplifitseerimisel paljundati sama pikk DNA-lõik; 2. RISA jaoks amplifitseeriti terve rDNA ITS regioon (18S lõpp kuni 28S algus) ning hilisemal reamplifitseerimisel paljundati lõik, mis hõlmas 18S lõpu kuni 5.8S regiooni (Joonis 8, Lisa 2). Terve rDNA ITS piirkonna amplifitseerimiseks kasutati praimeripaare ITS0F/ITS4, ITS1F/ITS4, ITS1/ITS4 ning ITS5/ITS4. Ribosoomi väikese alaühiku (18S) lõppu kuni 5.8S regiooni hõlmava lõigu amplifitseerimiseks kasutati primereid ITS5/ITS2, ITS5/AB-R310 ning ITS0F/AB-R310 (Lisa 2). DNA amplifitseerimisel RISA geeli jaoks ei ilmnunud kasutatud praimerite suhtes erinevusi. Samuti ei sõltunud reamplifitseerimise edukus valitud praimerite paaridest.



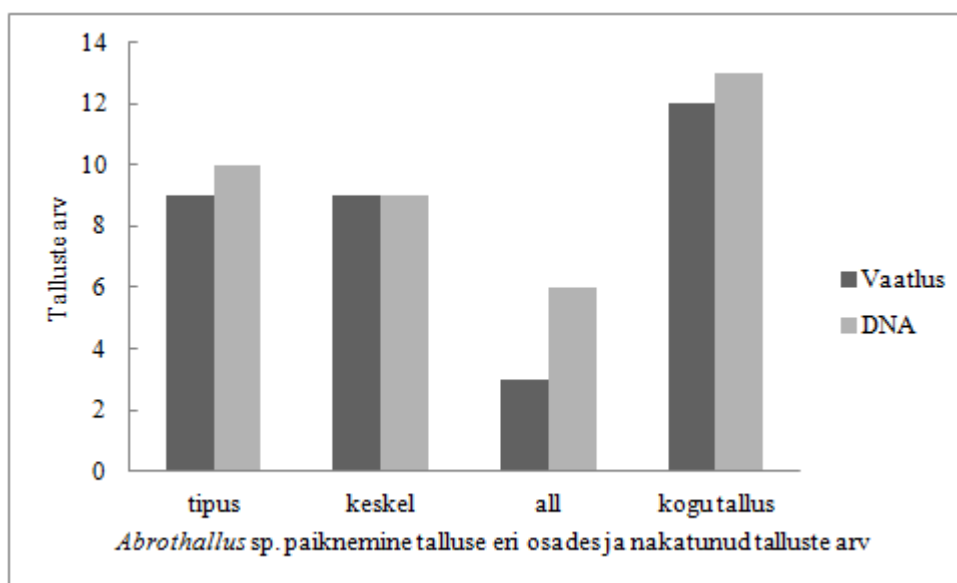
Joonis 8. RISA-s kasutatud praimerite ligikaudsed seondumiskohad rDNA piirkonnas. 18S, 5.8S ja 28S on ribosoomi kodeerivad geenid, nende vahele jäävad mittekodeerivad ITS1 ja ITS2 piirkonnad (Larena *et al.* 1999, muudetud).

RISA jaoks katsetati kolme erineva tihedusega agarosgeeli: 1,5%, 2% ja 2,5%. Geelide voolutusajad olid kas 1 h 15 min, 1 h 30 min või 2 h. Tihedama geeli ja/või pikema voolutusajaga prooviti saavutada amplifitseeritud DNA-lõikude paremat lahutuvust geelil. Pikem voolutusaeg ja tihedam geel võimaldasid küll vöotide paremat lahutuvust üksteisest, kuid sama DNA-segu näiteks 1,5% ja 2% geelil voolutamisel polnud erinevust vöotide arvus ühe raja kohta. Seega võib oletada, et väiksema tihedusega geelil ja/või lühema voolutusajaga ei jäänud osa vöote varjatuks, s.t ei lahutunud teineteisest nii vähe, et mitu vöoti oleksid tundunud ühe vöödina.

5.3. Seene *Abrothallus* sp. levik isendi ja transekti piires

Nelja transekti peale kokku oli talluseid 149, vaatlusandmete põhjal oli neist 40 (27%) nakatunud seenega *Abrothallus* sp. Proportsionaalselt kõige rohkem nakatunud talluseid oli

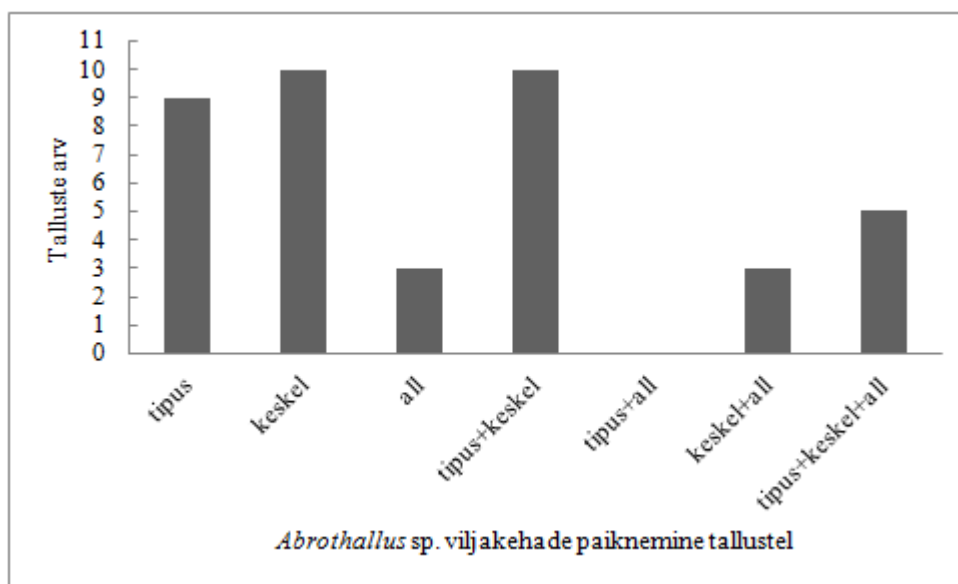
transektil IV, kus 35-st vaadeldud tallusest oli nakatunud 12 (34%). Sellele järgnes transekt I, kus 50-st tallusest oli nakatunud 16 (32%). Transektil III oli nakatunud talluseid 20-st kuus (30%) ning transektil II oli 44 tallusest nakatunud kuus (14%). Selget levikumustrit tehtud transektide piires ei tuvastatud, kuna nakatunud isendid paiknesid transektidel ebaselge mustriga (andmed pole esitatud). Neljandalt transektilt tuvastati DNA järjestuste põhjal 13 nakatunud tallust, kuid vaatlusandmete põhjal oli nakatunud 12 tallust (Joonis 9). Kusjuures DNA- ja vaatlusandmed kattusid kuue talluse piires, s.t kuuest tallusest tuvastati *Abrothallus* sp. olemasolu nii DNA-järjestuste kui ka vaatluste põhjal (Lisa 3). Kuuel islandi käokõrva tallusel oli näha *Abrothallus* sp. viljakehi, kuid nendest tallustest ei saadud uuritava seene DNA-d. Samas saadi seitsmest islandi käokõrva tallusest *Abrothallus* sp. DNA, kuigi viljakehi nendel tallustel ei tuvastatud.



Joonis 9. Lihhenikoolse seenega *Abrothallus* sp. nakatumine islandi käokõrva talluse piires, võrdlevalt DNA- ja vaatlusandmed IV transekti kohta. tipus – *Abrothallus* sp. talluse tipuosas; keskel – *Abrothallus* sp. talluse keskosas; all – *Abrothallus* sp. talluse alaosas; kogu tallus – näitab nakatunud talluste arvu. Vaatlus- ja molekulaarandmed kattuvad osaliselt, s.t nakatumist ei tuvastatud alati samade talluste samadest osadest.

Seene *Abrothallus* sp. esinemist hinnati ka ühe samblikutalluse piires. Kõigi transektide peale kokku saadi vaatluse põhjal enim positiivseid proove islandi käokõrva talluse keskosast võetud proovidest (28), mõnevõrra vähem tipmistest proovidest (24) ja kõige vähem alumistest proovidest (11) (Joonis 10). Neljandalt transektilt saadi võrdlevalt talluse tipust DNA põhjal kümme ning vaatluse põhjal üheksa positiivset proovi, kusjuures DNA- ja vaatlusandmed kattusid viiel korral; talluse keskelt tuvastati *Abrothallus* sp. nii DNA kui ka

vaatluse põhjal üheksal korral, kuid andmed kattusid ainult kahe proovi puhul; talluse alumistest osadest tuvastati DNA põhjal kuus ja vaatlusega kolm positiivset proovi, andmed kattusid kolme samblikutalluse osas (Joonis 9).



Joonis 10. Lihhenikoolse seenega *Abrothallus sp.* nakatumine islandi käokõrva talluse piires, I...IV transekti vaatlusandmete põhjal. tipus – *Abrothallus sp.* viljakehad talluse tipuosas; keskel – *Abrothallus sp.* viljakehad talluse keskosas; all – *Abrothallus sp.* viljakehad talluse alaosas; tipus+keskel – *Abrothallus sp.* viljakehad talluse tipu- ja keskosas; tipus+all – *Abrothallus sp.* viljakehad talluse tipu- ja alaosas; keskel+all – *Abrothallus sp.* viljakehad talluse kesk- ja alaosas; tipus+keskel+all – *Abrothallus sp.* viljakehad kogu talluse ulatuses.

Iga DNA-segu (kokku 105) kohta vaadati, kas vastavast proovist saadi *Abrothallus sp.* sekvents ning kui saadi, siis kas vastaval RISA-geelirajal oli üks või mitu DNA-vööti. 18 DNA-segu puhul saadi *Abrothallus sp.* sekvents ning RISA-geelil oli mitu vööti. Seitse DNA-segu olid sellised, kust saadi *Abrothallus sp.* sekvents ning mis andsid RISA-s ühe vöödi. 30 proovi andsid RISA-s mitu vööti, kuid seent *Abrothallus sp.* sekventsi kaudu ei tuvastatud. Ülejäänud 50 proovi andsid RISA-s ühe vöödi ning neist ei saadud *Abrothallus sp.* DNA-d.

6. Arutelu

Samblikes elavate taksonite uurimiseks on kasutatud erinevaid meetodeid, milledest osa põhineb mikroskopeerimisel ning osa DNA nukleotiidsete järjestuste võrdlemisel. Mikroskopeerimist nõudvate meetodite suurimaks puuduseks on, et suurel osal juhtudel pole võimalik tuvastada seent samblikutalluses juhul, kui seene paljunemisorganid pole veel välja kujunenud või kui puuduvad seene elutegevuse jäljed (kahjustused tallusel, pahad). Samblikku moodustava seene ja lihhenikoolse seene hüüfe on õnnestunud eristada vähestel kordadel, kasutades mikroskopeerimisel erinevaid proovide värvimistehnikaid (de los Ríos *et al.* 2002, Kotte 1909, Schaechetlin & Werner 1927) või skaneerivat elektronmikroskoopiat (de los Ríos *et al.* 2002, Fahselt *et al.* 2001). Edukamaks on osutunud tööd, kus on kasutatud mikroskopeerimist koos DNA-põhiste meetoditega (Pérez-Ortega *et al.* 2014, Werth *et al.* 2013). Sellist kombineeritud lähemisviisi on kasutatud ka käesolevas töös, kus eelnevalt hinnati lihhenikoolse seene olemasolu visuaalselt viljakehade põhjal ning seejärel võrreldi vaatlusel saadud tulemusi DNA järjestuste alusel saadud tulemustega.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada metoodika, mis võimaldaks määrata ühe kindla lihhenikoolse seene olemasolu samblikutalluses ka juhul, kui tallusel puuduvad nakatumisele viitavad välistunnused. Töö esimese etapi eesmärgiks oli disainida praimerid, millega saaks DNA-segust eraldada perekonda *Abrothallus* kuuluva lihhenikoolse seene DNA. Spetsiifiliste praimerite leidmist raskendas kasutatud sekventsides kõrge G ja C aluste osakaal (58...60%) ning hästi töötavaid primereid ei õnnestunud leida. Seene *Abrothallus* sp. DNA amplifitseerimiseks DNA-segust osutus kõige sobivamaks disainitud vastassuunaline praimer AB-R310, mis seondub rDNA 5.8S piirkonda.

RISA kasutamise eesmärgiks oli katsetada, kas selle meetodiga on võimalik määrata lihhenikoolse seene *Abrothallus* sp. olemasolu islandi käokõrva talluse eri osades. RISA meetodi eelduseks on, et ühel geelirajal olevad vöödid vastavad erinevatele DNA-segus olevatele taksonitele (Ranjard *et al.* 2000, Saag *et al.* 2012). RISA meetod on robustne, kuna võimaldab DNA-segust kätte saada ainult domineerivad taksonid (Ranjard *et al.* 2000). Seetõttu on RISA meetodi rakendamisel oluline spetsiifiliste praimerite valik, et DNA-segust kätte saada meid huvitavaid taksonid. Teisest küljest on meetod suhteliselt odav ning lihtsalt teostatav.

RISA-s saadi 43% kordadest mitme vöödiga geeliradasid, kuid vaid 21% kordadest kasutati DNA-segu, mis saadi seene *Abrothallus* sp. viljakehadega talluseosadest (Tabel 3, Lisa 3). Tõenäoliselt olid kasutatud DNA-segudes valdavateks taksoniteks islandi käokõrv ning seen *Abrothallus* sp. ning kuna RISA meetod võimaldab DNA-segust kätte saada domineerivad taksonid, siis võib oletada, et mitme vöödiga geeliradade puhul olid esindatud just need taksonid. Seega võib arvata, et uuritud tallustes oli lihhenikoolse seene esinemine ulatuslikum, kui ainult viljakehade esinemise põhjal võiks järeldada. Kindla vastuse sellele oletusele oleks andnud saadud DNA-vöötide sekveneerimine, kuid kasutatud meetodika nõrgaks kohaks on eelkõige probleemid geelist lõigatud DNA reamplifitseerimisel ja sekveneerimisel, mis on tõenäoliselt ka põhjus, miks molekulaarsed ja vaatlusandmed kattuvad vaid osaliselt. Ilmselt mõjub fuugimine ning külmkapis seismine geelist väljalõigatud DNA kvaliteedile halvasti, mistõttu reamplifitseerimine ning järgnev sekveneerimine õnnestusid vähestel juhtudel.

Erinevate RISA geeli tiheduste ja geeli voolutsaegade kombinatsioonides ei ilmnenu erinevusi vöötide arvus geelirajal, kuid pikem voolutsaeg ja tihedam geel võimaldavad vöötide paremat lahutuvust. DNA amplifitseerimisel RISA jaoks ning hilisemal reamplifitseerimisel ei ilmnenu kasutatud praimerite suhtes erinevusi, kuid pärast DNA-proovide sekveneerimisi selgus, et seene *Abrothallus* sp. DNA saadi seguproovist kätte eranditult ainult neil kordadel, kui RISA jaoks amplifitseeriti proovid praimeritega ITS5/AB-R310 (Lisa 3).

Molekulaarsete meetoditega tuvastati lihhenikoolse seene olemasolu ka sellistest tallustest või talluseosadest, kus viljakehi ei olnud, mistõttu vaatlusandmed ei pruugi alati täpselt kajastada lihhenikoolse seene levikut maastikus ja isendi piires. Tulemus on ootuspärane ning näitab, et vaid viljakehade esinemine või puudumine ei ole piisav argument seenega nakatumise ulatuse kindlaks tegemiseks (Gardes & Bruns 1996). See erineb seenega *Hypocreopsis rhododendri* (fungikoolne seen) läbi viidud tööst, kus leiti, et nimetatud liigi leviku hindamiseks piisab viljakehade leviku hindamisest (Grundy *et al.* 2012). Sarnaselt käesolevaga tööga on leitud, et ektomükoriissete seente puhul on seeneniidid laiemalt levinud kui viljakehad (Tedersoo *et al.* 2003, van der Linde *et al.* 2009).

Lihhenikoolse seene viljakehade domineerimine talluste nooremates tipmistes osades ja lihhenikoolse seene ebakorrapärane levik transektidel viitavad sellele, et seen levib (elistatult) mitte vanemalt järglasele, vaid horisontaalselt – isendilt isendile. Islandi käokõrv

on põõsasja tallusega samblik ning lihhenikoolse seene viljakehade paiknemine talluse tipmistes ja keskmistes osades annab tõenäoliselt seenele levimisel eelise, kuna võimaldab eostel levida kaugemale võrreldes sellega, kui viljakehad oleks maapinnale lähemal (Aylor 1999).

Seene *Abrothallus* sp. olemasolu kindlaks tegemiseks islandi käokõrva tallustes tuleks kasutada paralleelselt viljakehade esinemise hindamist ning molekulaarseid meetodeid. Selline kombineeritud uurimisviis annab lihhenikoolse seene leviku kohta rohkem informatsiooni nii isendi kui ka peremehe populatsiooni tasemel. RISA meetod on kasutatav seene *Abrothallus* sp. esinemise hindamiseks, kuid võiks katsetada, milliseid tulemusi annavad teised DNA-sõrmejälgede meetodid (nt. DGGE). Lihhenikoolse seene levikumustri edasiseks uurimiseks võiks proovida ka materjali kogumist teistsuguse skeemi alusel. Sugukonda *Parmeliaceae* kuuluvatel samblikel kasvavate perekonna *Abrothallus* taksonite DNA on väga vähe varieeruv. Sellest tulenevalt võiks uurida, kas sama piirkonna teistes, sugukonda *Parmeliaceae* kuuluvates samblikes esineb samade *Abrothallus* sp. taksonite DNA.

Kokkuvõte

Lihhenikoolsete ehk samblikel elunevate seente olemasolu hinnatakse enamasti seene viljakehade esinemise või samblikele tekitatavate kahjustuste kaudu. See aga ei võimalda hinnata lihhenikoolse seene tegelikku esinemist või puudumist nii peremees-sambliku isendi kui ka populatsiooni piires.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada meetodika, mis võimaldaks määrata lihhenikoolse seene olemasolu samblikutalluses ka juhul, kui tallusel puuduvad lihhenikoolse seene olemasolule viitavad kahjustused ja/või viljakehad. Töö objektideks olid perekonda *Abrothallus* kuuluv liigini määramata lihhenikoolne seen ning tema peremees-samblik islandi käokõrv (*Cetraria islandica*). Praktilise osa käigus hinnati lihhenikoolse seene olemasolu islandi käokõrva tallustes nii visuaalselt kui ka molekulaarsete meetodite abil.

- Töö esimeses osas anti ülevaade lihhenikoolsetest ja endolihhenikoolsetest seentest ning samblikes elavatest bakteritest ja nende uurimisel senini kasutatud uurimismeetoditest.
- Stereomikroskoobi all vaadeldi 149 samblikutallust, et kindlaks teha lihhenikoolse seene *Abrothallus* sp. viljakehade olemasolu islandi käokõrva tallustes.
- Molekulaarse uurimistöö esimese etapina disainiti praimereid seene *Abrothallus* sp. rDNA ITS lõigule ning seejärel kasutati ribosomaalse geenidevahelise speisserjärjestuse analüüsi (RISA), et määrata lihhenikoolse seene olemasolu islandi käokõrva talluse eri osades (tipu-, kesk- ja alaosas). Molekulaarses analüüsis kasutati IV transektilt kogutud 35 samblikutallust.

Olulisemad tulemused:

- lihhenikoolse seene *Abrothallus* sp. rDNA ITS lõigule disainiti vastassuunaline praimer AB-R310, mis seondub 5.8S piirkonda;
- RISA tulemused näitavad, et perekonda *Abrothallus* kuuluva lihhenikoolse seene levik islandi käokõrva tallustes ja populatsioonis on ulatuslikum, kui ainult viljakehade esinemise järgi võiks arvata. Seetõttu ei pruugi vaatlusandmed alati täpselt kajastada seene *Abrothallus* sp. levikut;
- samas ei olnud kasutatud molekulaarne meetodika piisav, et hinnata seene *Abrothallus* sp. tegelikku levikut samblikus, mistõttu tuleks lihhenikoolse seene olemasolu kindlaks tegemiseks kasutada paralleelselt vaatlus- ja molekulaarseid andmeid;

- lihenikoolse seene viljakehade domineerimine talluste tipmistes ja keskmistes osades viitab seene võimalikule horisontaalsele levikule (isendilt isendile).

**Allocating lichenicolous fungus from the genus *Abrothallus* in the thalli of Iceland moss
(*Cetraria islandica*)**

Annika Suu

Summary

The estimation of distribution of lichenicolous fungi (i.e. fungi that grow on lichens) is usually based on the occurrence of fruitbodies or damage caused by the fungus to the host lichen. However, it does not enable to estimate the real occurrence of lichenicolous fungi in the host population and even within the host thallus, and therefore the estimation of the population size of lichenicolous fungi needs more complicated approach than visual examination allows.

The aim of this study was to develop a method to detect the presence of a lichenicolous fungus in the host thallus even if the thallus shows no signs of infection. The objects of this study were a lichenicolous fungus from the genus *Abrothallus* (*Abrothallaceae*, *Dothideomycetes*) and its host lichen *Cetraria islandica* (*Parmeliaceae*, *Lecanoromycetes*). The presence of the lichenicolous fungus in host thalli was estimated using both examination with naked eye and with molecular methods.

- In the first part of the study, lichenicolous fungi, endolichenic fungi and bacteria living in lichens were briefly introduced and an overview of the methods used to study these organisms was given.
- 149 thalli of the lichen *Cetraria islandica* were examined using a stereomicroscope to detect the presence of *Abrothallus* fruitbodies.
- The first step of molecular analysis was designing primers for the rDNA ITS region of *Abrothallus* sp. Subsequently 35 lichen thalli were selected for the rRNA intergenic spacer analysis (RISA) to estimate the presence of *Abrothallus* sp. in different parts of the host thalli (upper, central and lower part).

The results:

- a reverse primer AB-R310, that binds to the 5.8S region, was designed for the rDNA ITS region of *Abrothallus* sp.;
- the result of RISA shows that the distribution of the lichenicolous fungus in the host population and also in the thalli of the host lichen is more widespread than based on

the incidence of fungal fruitbodies. For that reason the spatial distribution of fruitbodies of the lichenicolous fungus *Abrothallus* sp. does not always reflect the actual distribution of the fungus;

- the molecular method used in this study, however, was not sufficient to estimate the actual distribution of the lichenicolous fungus in the host thallus due to shortcomings in methodology. Therefore, both visual and molecular examination should be applied, to estimate the actual spatial distribution of the lichenicolous fungus;
- the fruitbodies of the lichenicolous fungus tend to be in the upper parts of the host thalli which implies to the horizontal spread (from specimen to specimen) of the studied lichenicolous fungus.

Tänuavaldused

Täna oma juhendajat, Ave Suijat, igakülgse abi eest töö valmimisel. Samuti täna Rasmus Puuseppa abi eest laboritöödel.

Kasutatud kirjandus

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. – *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Arnold, A. E., Henk, D. A., Eells, R. L., Lutzoni, F., Vilgalys, R. 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. - *Mycologia* 99(2): 185-206.
- Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Higgins, K. L., Sarvate, S. D., Gugger, P., Way, A., Hofstetter, V., Kauff, F., Lutzoni, F. 2009. A phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous fungi: are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? - *Systematic Biology* 58(3): 283-297.
- Aylor, D. E. 1999. Biophysical scaling and the passive dispersal of fungus spores: relationship to integrated pest management strategies. - *Agricultural and Forest Meteorology* 97: 275-292.
- Bates, S. T., Cropsey, G. W. G., Caporaso, J. G., Knight, R., Fierer, N. 2011. Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. - *Applied and Environmental Microbiology* 77(4): 1309-1314.
- Cardinale, M., Puglia, A. M., Grube, M. 2006. Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. - *FEMS Microbiology Ecology* 57(3): 484-495.
- Cardinale, M., Steinová, J., Rabensteiner, J., Berg, G., Grube, M. 2012. Age, sun and substrate: triggers of bacterial communities in lichens. - *Environmental Microbiology Reports* 4(1): 23-28.
- Crittenden, P. D., David, J. C., Hawksworth, D. L., Campbell, F, S. 1995. Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. - *New Phytologist* 130(2): 267-297.
- de los Ríos, A., Ascaso, C., Grube, M. 2002. Infection mechanisms of lichenicolous fungi studied by various microscopic techniques. - *Bibliotheca Lichenologica* 82: 153-161.
- Diederich, P. 2004. *Abrothallus*. - In: Nash III, T. H., Ryan, B. D., Diederich, P., Gries, C., Bungartz, F. (eds.), *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region, Vol. 2. Lichens Unlimited*. Arizona State University, Tempe, Arizona, pp. 626-630.

- Diederich, P., Ertz, D., Lawrey, J. D., Sikaroodi, M., Untereiner, W. A. 2013. Molecular data place the hyphomycetous lichenicolous genus *Sclerococcum* close to *Dactylospora* (*Eurotiomycetes*) and *S. parmeliae* in *Cladophialophora* (*Chaetothyriales*). - *Fungal Diversity* 58(1): 61-72.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., Dveksler, G. S. 1993. General concepts for PCR primer design. - *Genome Research* 3: 30-37.
- Fahselt, D., Madzia, S., Alstrup, V. 2001. Scanning Electron Microscopy of Invasive Fungi in Lichens. - *The Bryologist* 104(1): 24-39.
- Gardes, M., Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. - *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gardes, M., Bruns, T. D. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above-and below-ground views. - *Canadian Journal of Botany* 74: 1572-1583.
- Giegerich, R., Meyer, F., Schleiermacher, C. 1996. GeneFisher - software support for the detection of postulated genes. - *Proceedings of the International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* 4: 68-77.
- Grube, M., de los Ríos, A. 2001. Observations on *Biatoropsis usnearum*, a lichenicolous heterobasidiomycete, and other gall-forming lichenicolous fungi, using different microscopical techniques. - *Mycological Research* 105(9): 1116-1122.
- Grube, M., Berg, G. 2009a. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. - *Fungal Biology Reviews* 23(3): 72-85.
- Grube, M., Cardinale, M., Vieira de Castro Jr., J., Müller, H., Berg, G. 2009b. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. - *ISME Journal* 3: 1105-1115.
- Grube, M., Köberl, M., Lackner, S., Berg, C., Berg, G. 2012. Host-parasite interaction and microbiome response: effects of fungal infections on the bacterial community of the Alpine lichen *Solorina crocea*. - *FEMS Microbiology Ecology* 82: 472-481.

- Grundy, K. C., Woodward, S., Genney, D. R., Taylor, A. F. S. 2012. A molecular approach to explore the extent of the threatened fungus *Hypocreopsis rhododendri* within wood. - *Fungal Biology* 116: 354-362.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programm for Windows 95/98/NT. - *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hawksworth, D. L. 1981. The lichenicolous Coleomycetes. - *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series* 9(1): 98 pp.
- Hawksworth, D. L. 1988. The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. - *Botanical Journal of the Linnean Society* 96: 3-20.
- Hawksworth, D. L., Miadlikowska, J. 1997. New species of lichenicolous fungi occurring on *Peltigera* in Ecuador and Europe. - *Mycological Research* 101: 1127-1134.
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. - *Mycological Research* 105(12): 1422-1432.
- Hodkinson, B. P., Gottel, N. R., Schadt, C. W., Lutzoni, F. 2012. Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. - *Environmental Microbiology* 14(1): 147-161.
- Honegger, R. 2012. Lichen thalli: Consortia with Unknown Numbers of Participants. - In: Hock, B. (ed.), *The Mycota: Fungal Associations*. IX. Second edition. pp. 296-300.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H. 1990. Optimization of PCRs. - In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.), *PCR protocols – a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 3-12.
- Keller, M., Hettich, R. 2009. Environmental Proteomics: a Paradigm Shift in Characterizing Microbial Activities at the Molecular Level. - *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73(1): 62-70.
- Kotte, I. 1909. Einige neue Fälle von Nebensymbiose (Parasymbiose). - *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde II* 24: 74-93.

- Larena, I., Salazar, O., Gonzalez, V., Julian, M. C., Rubio, V. 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. - *Journal of Biotechnology* 75: 187-194.
- Lawrey, J. D., Diederich, P. 2003. Lichenicolous Fungi: Interactions, Evolution, and Biodiversity. - *The Bryologist* 106(1): 80-120.
- Lawrey, J. D., Binder, M., Diederich, P., Molina, M. C., Sikaroodi, M., Ertz, D. 2007. Phylogenetic diversity of lichen-associated homobasidiomycetes. - *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 778-789.
- Lawrey, J. D., Diederich, P., Nelsen, M. P., Freebury, C., Van den Broeck, D., Sikaroodi, M., Ertz, D. 2012. Phylogenetic placement of lichenicolous *Phoma* species in the *Phaeosphaeriaceae* (Pleosporales, Dothideomycetes). - *Fungal Diversity* 55(1): 195-213.
- Li, W.-C., Zhou, J., Guo, S.-Y., Guo, L.-D. 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. - *Fungal Diversity* 25: 69-80.
- Molina, M. C., DePriest, P. T., Lawrey, J. D. 2005. Genetic variation in the widespread lichenicolous fungus *Marchandiomyces corallinus*. - *Mycologia* 97(2): 454-463.
- Muggia, L., Grube, M. 2010. Fungal composition of lichen thalli assessed by single strand conformation polymorphism. - *The Lichenologist* 42(4): 461-473.
- Mushegian, A. A., Peterson, C. N., Baker, C. C. M., Pringle, A. 2011. Bacterial diversity across individual lichens. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4249-4252.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. - *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. - *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Pankratov, T. A. 2012. *Acidobacteria* in microbial communities of the bog and tundra lichens. - *Microbiology* 81(1): 51-58.

- Pérez-Ortega, S., Suija, A., de los Ríos, A. 2011. The connection between *Abrothallus* and its anamorph state *Vouauxiomyces* established by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). - *The Lichenologist* 43(3): 277-279.
- Pérez-Ortega, S., Suija, A., Crespo, A., de los Río, A. 2014. Lichenicolous fungi of the genus *Abrothallus* (*Dothideomycetes: Abrothallales* ordo nov.) are sister to the predominantly aquatic *Janhulales*. - *Fungal Diversity* 64 (1): 295-304.
- Peršoh, D., Rambold, G. 2012. Lichen-associated fungi of the Letharietum vulpinae. - *Mycological Progress* 11(3): 753-760.
- Peterson, C. N., Day, S., Wolfe, B. E., Ellison, A. M., Kolter, R., Pringle, A. 2008. A keystone predator controls bacterial diversity in the pitcher-plant (*Sarracenia purpurea*) microecosystem. - *Environmental Microbiology* (2008) 10(9): 2257-2266.
- Prewitt, M. L., Diehl, S. V., McElroy, T. C., Diehl, W. J. 2008. Comparison of general fungal and basidiomycete-specific ITS primers for identification of wood decay fungi. - *Forest Products Journal* 58(4): 66-71.
- Randlane, T., Saag, A., Jüriado, I., Lõhmus, P., Nilson, E., Saag, L., Suija, A. 2004. Eesti pisisamblikud. - Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu. 583 lk.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Gourbiere, F., Thioulouse, J., Nazaret, S. 2000. Heterogeneous Cell Density and Genetic Structure of Bacterial Pools Associated with Various Soil Microenvironments as Determined by Enumeration and DNA Fingerprinting Approach (RISA). - *Microbial Ecology* 39(4): 263-272.
- Richardson, D. H. S. 1999. War in the world of lichens: parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. - *Mycological research* 103(6): 641-650.
- Saag, P., Kilgas, P., Mägi, M., Tilgar, V., Mänd, R. 2012. Inter-annual and body topographic consistency in the plumage bacterial load of Great Tits. - *Journal of Field Ornithology* 83(1): 94-100.
- Schaechtelin, J., Werner, R. G. 1927. Développement et biologie de l'*Abrothallus parmeliarum* Smft. - *Bulletin de la Société mycologique de France* 42: 233-243.

Schneider, T., Schmid, E., de Castro, J. V., Cardinale, M., Eberl, L., Grube, M., Berg, G., Riedel, K. 2011. Structure and function of the symbiosis partners of the lung lichen (*Lobaria pulmonaria* L. Hoffm.) analyzed by metaproteomics. - *Proteomics* 11: 2752-2756.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Kõljalg, U., Tedersoo, L. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16): 6241-6246.

Suija, A., Pérez-Ortega, S., Crespo, A. 2008. The first outline of the phylogeny of the lichenicolous genus *Abrothallus* (*Ascomycota*) based on nuITS. - *Abstracts for IAL 6- ABLIS Joint Meeting*.

Tedersoo, L., Kõljalg, U., Hallenberg, N., Larsson, K.-H. 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. - *New Phytologist* 159: 153-165.

Tedersoo, L., Jairus, T., Horton, B. M., Abarenkov, K., Suvi, T., Saar, I., Kõljalg, U. 2008. Strong Host Preference of Ectomycorrhizal Fungi in a Tasmanian Wet Sclerophyll Forest as Revealed by DNA Barcoding and Taxon-Specific Primers. - *New Phytologist* 180(2): 479-490.

Trass, H., Randlane, T., Liiv, S., Martin, J., Martin, L., Nilson, E., Parmasto, E., Pärn, A., Püttsepp, J., Roosma, A., Saag, A., Sander, E., Zobel, K. 1994. Eesti Suursamblikud. - Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu. 399 lk.

U'Ren, J. M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., Arnold, A. E. 2010. Community analysis reveals close affinities between endophytic and endolichenic fungi in mosses and lichens. - *Microbial ecology* 60: 340-353.

U'Ren, J. M., Riddle, J. M., Monacell, J. T., Carbone, I., Miadlikowska, J., Arnold, A. E. 2014. Tissue storage and primer selection influence pyrosequencing-based inferences of diversity and community composition of endolichenic and endophytic fungi. - *Molecular Ecology Resources*, in press.

van der Linde, S., Alexander, I. J., Anderson, I. C. 2009. Spatial distribution of sporocarps of stipitate hydroid fungi and their belowground mycelium. - *FEMS Microbiology Ecology* 69: 344-352.

Werth, S., Millanes, A. M., Wedin, M., Scheidegger, C. 2013. Lichenicolous fungi show population subdivision by host species but do not share population history with their hosts. - *Fungal Biology* 117(1): 71-84.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. - In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds), PCR protocols – a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. pp. 315–322.

Internetileheküljed

GeneFisher.

[<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>] 16. 02. 2013

Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer 3.1.

[<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>]. 16. 02. 2013

BLAST.

[<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. 01. 04. 2014

Index Fungorum.

[<http://www.indexfungorum.org>] 01. 10. 2013

Lisad

Lisa 1. Preamerite disainimisel kasutatud võrdlusmaterjal.

DNA proovi kood	Liik	Selts	Klass	Herbaareksemplari kood
AB21	<i>Abrothallus suecicus</i>	<i>Abrothallales</i>	<i>Dothideomycetes</i>	TU45302
AB25	<i>Abrothallus cetrariae</i>	<i>Abrothallales</i>	<i>Dothideomycetes</i>	TU65894
AB42	<i>Abrothallus welwitschii</i>	<i>Abrothallales</i>	<i>Dothideomycetes</i>	BR-Lich-1639-87
AB63	<i>Abrothallus</i> sp.	<i>Abrothallales</i>	<i>Dothideomycetes</i>	TU65893
AB67*	<i>Abrothallus</i> sp.	<i>Abrothallales</i>	<i>Dothideomycetes</i>	IVL 5491
AB70*	<i>Abrothallus</i> sp.	<i>Abrothallales</i>	<i>Dothideomycetes</i>	TU65600
AB71	<i>Abrothallus</i> sp.	<i>Abrothallales</i>	<i>Dothideomycetes</i>	TU64149
AB72	<i>Abrothallus</i> sp.	<i>Abrothallales</i>	<i>Dothideomycetes</i>	TU64949
CE1	<i>Cetraria islandica</i>	<i>Lecanorales</i>	<i>Lecanoromycetes</i>	TU
NE72	<i>Nectriopsis lecanodes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Sordariomycetes</i>	TU64964
PAR SER	<i>Parmelia serrana</i>	<i>Lecanorales</i>	<i>Lecanoromycetes</i>	TU45799
UNG71	<i>Unguiculariopsis lettaui</i>	<i>Helotiales</i>	<i>Leotiomycetes</i>	TU64867

Lisa 2. RISA-s ja reamplifitseerimisel kasutatud praimerid.

RISA geel	ampl. praimerid	reamp. 1	reamp. 2	reamp. 3
I.I	ITS5 / AB-R310	ITS5 / AB-R310	ITS5 / AB-R310	-
	ITS1F / ITS4	ITS1F / ITS4	ITS5 / ITS4	-
I.II	ITS5 / AB-R310	ITS5 / AB-R310	ITS5 / AB-R310	-
	ITS0F / ITS4	ITS1F / ITS4	ITS1F / ITS4	-
II	ITS5 / AB-R310	ITS5 / AB-R310	ITS5 / AB-R310	ITS5 / ITS2
III	ITS5 / AB-R310	ITS5 / AB-R310	ITS5 / ITS2	-
IV.I	ITS5 / ITS2	-	-	-
IV.II	ITS5 / AB-R310	ITS5 / ITS2	ITS5 / AB-R310	-
		-	ITS5 / ITS2	-
V	ITS5 / AB-R310	ITS5 / ITS2	ITS5 / AB-R310	-
VI	ITS0F / ITS4	ITS5 / AB-R310	ITS5 / AB-R310	-
		ITS5 / ITS2	ITS5 / ITS2	-
VII	ITS0F / ITS4	ITS5 / ITS2	-	-
		ITS5 / AB-R310	-	-
	ITS5 / AB-R310	ITS5 / ITS2	-	-
		ITS5 / AB-R310	-	-
VIII	ITS0F / ITS4	ITS5 / AB-R310	ITS0F / ITS4	-
IX	ITS0F / ITS4	ITS5 / AB-R310	-	-
X	ITS1 / ITS4	ITS5 / AB-R310	ITS0F / AB-R310	ITS0F / AB-R310
		ITS1F / ITS4	ITS0F / ITS4	-
XI	ITS0F / ITS4	ITS5 / AB-R310	-	-

Lisa 3. Molekulaarses analüüsis kasutatud proovid ning saadud tulemused. Talluse tähis 'IV S20' – IV on transekti number; N, S, E, W näitab suunda transekti keskpunktist; '20' näitab sentimeetrites kaugust transekti keskpunktist. t – tipust võetud proov; k – keskelt võetud proov; a – alt võetud proov. '*' talluseproovi numbriga juures – sellel talluseosal olid *Abrothallus* sp. viljakehad. Vöötide arv RISA geelil – erinevatel RISA geelidel oli nii mitu vööti. Semikooloniga eraldatud sekveneerimise tulemused – saadud sama talluseproovi erinevatest RISA geeli vöötidest. 'ja' – sekveneerimise tulemused vastavad samale vöödile RISA geelil. Tähistus '*arv' sekveneerimise tulemustes – nii mitu korda saadi sama RISA geeli vöödi kohta sama organism.

Tallus	Talluseosa ja proovi nr.	RISA praimerid	Vöote RISA geelil	Sekveneerimise tulemus
IV S20	t – 1	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310	2; 2	<i>Abrothallus</i> sp.; <i>Abrothallus</i> sp.
	k – 2	ITS5/AB-R310	2	<i>Abrothallus</i> sp.; <i>Abrothallus</i> sp.
	a – 3	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310	2; 2	<i>Abrothallus</i> sp.
IV S30	t – 4	ITS5/AB-R310	2	<i>Abrothallus</i> sp.; <i>Abrothallus</i> sp.
	k – 5	ITS5/AB-R310	1	<i>Abrothallus</i> sp.
	a – 6	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310	2; 2	<i>Abrothallus</i> sp. ja <i>Penicillium</i> sp.
IV S40	t – 7	ITS5/AB-R310	1	<i>Abrothallus</i> sp.
	k – 8	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310	1; 1	<i>Abrothallus</i> sp.
	a – 9	ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1	islandi käokõrv

IV S130	t – 10	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1; 1	islandi käokõrv
	k – 11	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310	2; 2	<i>Abrothallus</i> sp.*2; <i>Abrothallus</i> sp.
	a – 12	ITS5/AB-R310	1	<i>Abrothallus</i> sp.
IV S140	t – 13	ITS5/AB-R310	1	islandi käokõrv
	k – 14	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	2; 2; 1	islandi käokõrv
	a – 15	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	2; 2; 2	islandi käokõrv*2
IV S150	t – 16	ITS5/AB-R310	2	<i>Abrothallus</i> sp.
	k – 17	ITS5/AB-R310	1	<i>Abrothallus</i> sp.
	a – 18	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	2; 1; 1	islandi käokõrv
IV W10	t – 19*	ITS5/AB-R310	2	<i>Abrothallus</i> sp.
	k – 20*	ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	3; 2	-
	a – 21*	ITS5/AB-R310	3	<i>Abrothallus</i> sp.
IV W20	t – 22*	ITS5/AB-R310	2	<i>Abrothallus</i> sp.

	k – 23*	ITS5/AB-R310	2	<i>Abrothallus</i> sp.; <i>Abrothallus</i> sp.
	a – 24*	ITS5/AB-R310	1	<i>Abrothallus</i> sp.
IV W70	t – 25*	ITS5/AB-R310	2	<i>Abrothallus</i> sp.; <i>Abrothallus</i> sp.
	k – 26*	ITS5/AB-R310	3	<i>Abrothallus</i> sp.
	a – 27*	ITS5/AB-R310	3	<i>Abrothallus</i> sp.
IV W140	t – 28*	ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	2; 1; 2; 2	<i>Abrothallus</i> sp.; islandi käökõrv*2
	k – 29	ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	2; 1; 1; 1	islandi käökõrv*2
	a – 30	ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	3; 2; 1; 3	islandi käökõrv*2
IV W150	t – 31*	ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310	2; 2; 2; 2; 2	<i>Abrothallus</i> sp.*2
	k – 32*	ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	2; 2; 2; 2	islandi käökõrv
	a – 33	ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 2; 1; 2	<i>Hyaloscyphaceae</i> *2
IV N10	t – 34	ITS5/AB-R310	1	<i>Abrothallus</i> sp.

	k – 35	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	2; 1; 1	<i>Antrodia serialis</i> ja islandi käokõrv
	a – 36	ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1; 2	islandi käokõrv*2
IV N30	t – 37	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1; 1; 1	islandi käokõrv
	k – 38	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310	1; 2	<i>Abrothallus</i> sp.
	a – 39	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310	1; 3	islandi käokõrv
IV N40	t – 40*	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1; 1; 2	islandi käokõrv*2
	k – 41	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310	1; 2	<i>Abrothallus</i> sp.; <i>Abrothallus</i> sp.
	a – 42	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1; 1; 1	islandi käokõrv
IV N50	t – 43	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1; 1; 1	islandi käokõrv
	k – 44*	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1; 1	islandi käokõrv
	a – 45	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1; 1	islandi käokõrv
IV N70	t – 46	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4	1; 1; 1	islandi käokõrv
	k – 47	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310	1; 1; 1; 2	islandi käokõrv*3

	a – 48	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310	1; 2; 2; 2	islandi käokõrv*3; <i>Hyaloscyphaceae</i>
IV N80	t – 49	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310	1; 1; 1; 1	islandi käokõrv*2
	k – 50	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310	1; 1; 1; 1	islandi käokõrv*3
	a – 51	ITS5/ITS2; ITS5/AB-R310; ITS0F/ITS4; ITS5/AB-R310	1; 2; 1; 1	islandi käokõrv*4; <i>Trichophyton rubrum</i>
IV N90	t – 52	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 53	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 54	ITS0F/ITS4	2	islandi käokõrv; <i>Hyaloscyphaceae</i>
IV N100	t – 55	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 56	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 57	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
IV N110	t – 58	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 59*	ITS0F/ITS4; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4	2; 3; 2	islandi käokõrv

	a – 60	ITS0F/ITS4; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4	2; 2; 2	-
IV N130	t – 61	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 62*	ITS0F/ITS4; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4	2; 2; 2	-
	a – 63	ITS0F/ITS4	2	-
IV N140	t – 64*	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 65	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 66	ITS0F/ITS4; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4	2; 1; 2	-
IV 00	t – 67*	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 68*	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 69	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
IV E10	t – 70	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 71	ITS0F/ITS4; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4	2; 2; 2	kottseen
	a – 72	ITS0F/ITS4	2	kottseen

IV E30	t – 73	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 74	ITS0F/ITS4	2	islandi käokõrv
	a – 75	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
IV E40	t – 76	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 77	ITS0F/ITS4	2	islandi käokõrv
	a – 78	ITS0F/ITS4; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4	2; 1; 2	-
IV E60	t – 79	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 80	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 81	ITS0F/ITS4	2	islandi käokõrv
IV E70	t – 82	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 83	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 84	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
IV E80	t – 85	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv

	k – 86	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 87	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
IV E100	t – 88	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 89	ITS0F/ITS4; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4	2; 3; 2	kottseen
	a – 90	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
IV E110	t – 91*	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 92*	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 93	ITS0F/ITS4; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4	2; 2; 1	-
IV E120	t – 94	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 95	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 96	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
IV E130	t – 97	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 98	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv

	a- 99	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
IV E140	t – 100	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 101	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 102	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
IV E150	t – 103	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	k – 104	ITS0F/ITS4	1	islandi käokõrv
	a – 105	ITS0F/ITS4; ITS1/ITS4; ITS0F/ITS4	2; 2; 2	kottseen

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Annika Suu (sündinud 05. veebruar 1990)

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

"Perekonda *Abrothallus* kuuluva lihhenikoolse seene määramine islandi käokõrva (*Cetraria islandica*) tallustest", mille juhendaja on Ave Suija,

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. mai 2014