

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT  
BOTAANIKA OSAKOND

**Loimurite tuvastamine keskkonnaproovide DNA-st**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Natalia Sirenko

Juhendaja: Sten Anslan, PhD

TARTU 2023

## INFOLEHT

### **Loimurite tuvastamine keskkonnaproovide DNA-st**

Loimurid on hõimkond mikro-loomi, keda leidub peaaegu igas ökosüsteemis. Loimurite määramine morfoloogia kaudu on raske ja töömahukas, kuid üheks kiiremaks alternatiiviks on nende tuvastamine DNA-triipkoodi kaudu, kus on oluline õigete praimerite valik. Antud bakalaureusetöö raames võrreldakse Topstad *et al.* (2021) töös avaldatud (modifitseerimata) ja käesolevas töös modifitseeritud praimerite efektiivsust loimuri COI ja 18S rRNA V4 regioonide amplifitseerimiseks eDNA proovidest, mille korjamise meetodid ei olnud loimurispetsiifilised. Modifitseeritud praimerid amplifitseerisid loimurite DNA-d efektiivsemalt proovides, kus substraatideks olid vesi ja samblad. Seda näitas suurem tuvastatud OTU-de arv, mis peegeldab antud töös ka liigirikkust. Lisaks töös hinnati loimurite perekondade mitmekesisust erinevates keskkonnaproovides. Kõige rohkem loimurite perekondi tuvastati mullaproovides ja kõige vähem tuvastati samblike proovides.

Märksõnad: loimurid, DNA triipkoodistamine, PCR praimerid

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Detection of tardigrades in environmental DNA samples**

Tardigrades are a phylum of micro-animals that are found almost everywhere on Earth. Tardigrades are usually identified by morphological characteristics, but it is challenging and time-consuming. DNA barcoding is one of the fastest alternatives to identify species, where the selection of correct primers is important. In the following study, the effectiveness of two types of PCR primers (presented in Topstad *et al.* (2021) article and modified in this study) for tardigrade 18S rRNA V4 and COI regions were compared. Furthermore, this study focused on assessing genus richness in eDNA samples, which were extracted without specifically targeting tardigrades. Modified versions of PCR primers amplified needed regions more efficiently in water and moss samples, as indicated by the increased number of tardigrade OTU-s. The highest number of tardigrade genera were found in soil samples and the lowest in lichen samples.

Keywords: tardigrades, DNA barcoding, PCR primers

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

## SISUKORD

<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	4
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	5
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	7
1.1. Loimurite iseloomustus.....	7
1.2. Loimurite elujõulisus.....	7
1.3. Loimurite kasutamine bioindikaatoritena.....	8
1.4. Loimurite määramine.....	9
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA</b> .....	11
2.1. Töö eesmärgid.....	11
2.2. Materjal ja meetodika.....	11
2.2.1. Keskkonnaproovid.....	11
2.2.2. PCR praimerid.....	12
2.2.3. PCR.....	13
2.2.4. Geelelektroforees.....	14
2.2.5 PCR-produktide kogud.....	15
2.2.6. Andmeanalüüs.....	16
2.3. Tulemused ja arutelu.....	16
2.3.1. PCR.....	16
2.3.2. COI praimerid.....	17
2.3.3. 18S rRNA V4 regiooni praimerid.....	18
2.3.3.1. Tuvastatud organismide ülevaade.....	18
2.3.3.2. Erinevate praimeripaaride mõju.....	22
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	27
<b>RESÜMEE</b> .....	28
<b>KIRJANDUSE LOETELU</b> .....	30
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID</b> .....	35
<b>LISAD</b> .....	36
<b>LIHTLITSENTS</b> .....	45

## KASUTATUD LÜHENDID

ASV - DNA-markerlõigu järjestuse variant (*amplicon sequenvariant*)

bp - aluspaar (*base pair*)

Dsup - kahjustuse summutamise valk (*damage suppressor protein*)

eDNA - keskkonna DNA (*environmental DNA*)

LC50 - keskmine surmav kontsentratsioon (*lethal concentration 50*)

mRNA - informatsiooni-RNA (*messenger RNA*)

COI - tsütokroom c oksüdaasi I subühiku geen (*cytochrome c oxidase subunit I*)

OTU - molekulaar-taksonoomiline üksus (*operational taxonomic unit*)

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PERMANOVA - permutatsiooniline mitmemõõtmeline dispersioonanalüüs (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*)

rRNA - ribosomaalne RNA (*ribosomal RNA*)

SAR - *Stramenopila*, *Alveolata* ja *Rhizaria*

TAN - kogu ammoniumlämmastik (*total ammonia nitrogen*)

TDP - loimuri spetsiifilised sisemiselt korrastamata valgud (*tardigrade-specific intrinsically disordered proteins*)

## SISSEJUHATUS

Loimurid on mikroloomad, kes on levinud üle maailma (Hashimoto *et al.*, 2016). Neid peetakse väga elujõulisteks organismideks, kuna loimurid jäävad ellu erinevates äärmuslikes tingimustes (Jönsson, 2019). Peamise kaitsemehhanismina kasutavad loimurid krüptobioosi - seisund, millal metabolism on aeglustatud (Rebecchi *et al.*, 2007), kuid teatud loimurite liigid on vastupidavad ka aktiivses seisundis unikaalsete kaitsemehhanismide tõttu (Møbjerg *et al.*, 2011). Loimurite kaitsemehhanismid pakuvad huvi paljudes valdkondades ning nende elujõulisust testitakse erinevatel viisidel. Näiteks, uuritakse erinevate kemikaalide ning temperatuuride kõikumiste mõju nende elujõulisusele (Ramløv ja Westh, 2001), kuid loimurite elulemust on mõõdetud ka kosmoses (Jönsson *et al.*, 2008). Samuti uuritakse loimurite geenide sisestamist taimede (Kirke *et al.*, 2020) ja inimeste (Hashimoto *et al.*, 2016) rakkudesse, mis omakorda võiks suurendada organismide elujõulisust stressitingimustes. Loimurite stressiga seotud geenide inimeste rakkudesse sisseviimine suurendab nende vastupidavust osmoostsele stressile ja ioniseerivale kiirgusele (Jönsson, 2019). On teada, et inimese rakud, kuhu on sisse viidud DNA-ga seotud kahjustuste summutamise (Dsup) valku kodeeriv geen on umbes 40% vastupidavamad röntgenkiirgusele, kuna nende DNA kahjustused kiirgusest vähenevad (Hashimoto *et al.*, 2016). Seega, loimurite kaitsemehhanismide uurimine on oluline nii meditsiinis kui ka üldiselt teaduses.

Kuigi loimurid võivad äärmuslikes keskkonnatingimustes ellu jääda, on tegureid mis mõjutavad negatiivselt nende populatsiooni tihedust – madal pH (Massa *et al.*, 2023), teatud kemikaalide ja raskemetallide esinemine keskkonnas (Barrett ja Kimmel, 1972). Seetõttu on loimureid uuritud ka kui bioindikaatoreid, kelle liigiline koosseis ja populatsioonide tihedused annavad teavet ökosüsteemi üldisest seisundist (Zaghloul *et al.*, 2020). Paljudest keskkonnaproovidest loimurite määramine morfoloogiliste tunnuste kaudu võib olla üsna töömahukas, kuid üheks kiiremaks alternatiiviks on nende tuvastamine DNA-triipkoodi kaudu (Deiner *et al.*, 2017). Loimurite määramiseks kasutatakse mitokondriaalset tsütokroom c oksüdaas I subühiku valku kodeerivat geeni (COI) ja 18S ribosomaalse RNA (rRNA) geeni V4 regiooni DNA-triipkoodistamise meetodil kasutatavate polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) praimerite valik on liikide tuvastamisel olulise tähtsusega.

Antud bakalaureusetöö põhieesmärk oli hinnata, mis PCR praimerid sobivad rohkem COI ja 18S rRNA V4 regioonide amplifitseerimiseks erinevates keskkonna DNA (eDNA) proovides ning mis regioon sobib rohkem loimurite tuvastamiseks. Samuti selgitatakse töös välja, kas

loimureid on võimalik tuvastada erinevates keskkonnaproovides, mille korjamise meetodid ei olnud loimurispetsiifilised.

Antud bakalaureusetöö eksperimentaalne osa on viidud läbi Tartu Ülikooli Ökoloogia ja Maateaduste Instituudis, mükoloogia õppetooli laboris.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1. Loimurite iseloomustus

Loimurid on hõimkond mikro-loomi, kelle keha pikkus varieerub 50-1500 µm (Thorp ja Rogers, 2016). Loimurid on enamasti värvitud (Bingemer ja Hohberg, 2017), omavad neli jäsemete paari ja nende keha on bilateraalselt sümmeetriline (Kaczmarek, 2021). Nad on hüdrofiilsed mikroloomad ning nad on levinud üle maailma (Thorp ja Rogers, 2016). Hetke seisuga (01.2023) on kirjeldatud 1464 loimuriliiki, kes jagunevad saja viiekümne üheksasse (159) perekonda, kolmekümne kolme (33) sugukonda (Degma *et al.*, 2023) ning kahte klassi - *Eutardigrada* ja *Heterotardigrada* (Thorp ja Rogers, 2016). Viimase nelja aasta jooksul on kirjeldatud keskmiselt 41 uut loimurite liiki (Degma *et al.*, 2023), seega nende tegelik liigirikkus on tõenäoliselt veel suurem (Ono *et al.*, 2022). Loimureid on tuvastatud nii mere setteproovides kui ka kõrgel mägedes korjatud pinnaseproovides (Nelson, 2002). Peamiselt eelistavad loimurid elamiseks samblike ja samblaid (Nelson, 2002; Topstad *et al.*, 2021), mõned liigid elavad aga järvede, jõgede, põhjavee, tiikide settetes või seal leiduvate veetaimede peal (Thorp ja Rogers, 2016). Loimurid on enamasti herbivoorid, kuid esineb ka karnivoorseid liike, kes toituvad keriloomadest, nematoodidest või teistest loimuritest (Meglitsch ja Schram, 1991).

### 1.2. Loimurite elujõulisus

Äärmuslikes tingimustes ellujäämiseks sisenevad enamus loimurite liikidest krüptobioosi (Rebecchi *et al.*, 2007) — seisund, kui organismil puuduvad nähtavad elumärgid ja selle metaboolne aktiivsus on vaevalt mõõdetav või peatub pöördvalt (Keilin, 1959). Erinevaid krüptobioosi vorme kutsuvad esile tingimused nagu organismi jahutamine (krüobioos), hapniku puudus (anoksübioos), soola kontsentratsiooni tõus keskkonnas (osmobioos), kuivus (anhüdrobioos) (Clegg, 2001) või toksilised kemikaalid (kemobioos) (Møbjerg *et al.*, 2011). Krüptobioosi sisenenud organism ei toitu, paljune, kasva ega replitseeri oma DNA-d (Rebecchi *et al.*, 2007). Kuigi loimurid on loomad, kes vajavad paljunemiseks veekeskkonda (Jönsson ja Guidetti, 2001), võivad mõned liigid jääda ellu täielikus kuivuses, mille juures sisenevad loimurid anhüdrobioosi (Jönsson ja Bertolani, 2001). Samuti lisaks kuivusele aitab anhüdrobioos mõnedel loimurite liikidel ellu jääda teistes ekstreemsetes tingimustes (Ramløv ja Westh, 2001). Näiteks anhüdrobioosis olevad loimurid liigist *Richtersius coronifer* võivad ellu jääda 70 °C kuumuse juures kuni tund aega (Ramløv ja Westh, 2001). Kuid mida kauem kestab anhüdrobioos, seda suuremad on kahjustused loimuri DNA-s (Rebecchi *et al.*, 2009),

kuna krüptobioos ei kaitse loomi oksüdatiivsete protsesside eest, mis kahjustavad DNA-d (Møbjerg *et al.*, 2011).

Krüptobioosi seisundis on erinevad loimurite liigid võimelised ellu jääma ka teistes äärmuslikes tingimustes: temperatuuridel alates absoluutsest nullist (-273 °C) (Jönsson ja Bertolani, 2001) kuni 100 °C (Hengherr *et al.*, 2009), samuti kokkupuutel erinevate toksiliste kemikaalidega (näiteks töötlemisel metüülbromiidiga) (Jönsson ja Guidetti, 2001). Loimurid taluvad ka ioniseerivat kiirgust, vaakumi (Welnicz *et al.*, 2011) ja suurt hüdrostaatilist rõhku (Jönsson ja Bertolani, 2001). Kui keskkonna abiootilised tegurid kõiguvad, on teatud liigid (näiteks *Halobiotus crispae*, *Richtersius coronifer*) võimelised ellu jääma ka oma aktiivses seisundis, ilma krüptobioosi sisenemiseta. See võib olla põhjustatud efektiivsete DNA parandamismehhanismidega nendes liikides (Møbjerg *et al.*, 2011). On arvatud, et loimuri rakke kaitseb stressi eest mitteredutseeriv suhkur, trehaloos (Hengherr *et al.*, 2008), mis stabiliseerib rakke vitrifikatsiooni käigus ning asendab vett (Clegg, 2001). Kuid mõõtes trehaloosi kontsentratsiooni anhüdrobioosis olevates loimurites selgus, et mõnedel liikidel on see väga madal või puudub (Hengherr *et al.*, 2009). See tähendab, et trehaloos ei osale nii aktiivselt loimurite rakkude kaitses stressitingimustes kui varasemalt arvatud (Hengherr *et al.*, 2009). Vastuseks kuivamisele toimub loimuritel loimurispetsiifiliste sisemiselt korrastamata valkude (TDP) ülesreguleerimine ning on tuvastatud, et TDP-de ekspressiooni häire vähendab oluliselt kuivamise taluvust (Boothby *et al.*, 2017). Nende valkude hulka kuulub ka liikide *Hypsibius exemplaris* ja *Ramazzottius varieornatus* Dsup valk (Mínguez-Toral *et al.*, 2020), mis aitab loimuritel taluda ioniseerivat kiirgust (Chavez *et al.*, 2019). Dsup seob kromatiiniga ning kaitseb DNA-d kahjustustest, mis on tingitud hüdroksüül-radikaalidest (Chavez *et al.*, 2019).

### **1.3. Loimurite kasutamine bioindikaatoritena**

Bioindikaatorid on elusorganismid, kes on tundlikud muutustele ökosüsteemis (Zaghloul *et al.*, 2020). Bioindikaatorliikide kooseisu ja populatsioonide tiheduse abil on võimalik hinnata reostust ja üldist keskkonnaseisundit (Parmar *et al.*, 2016; Zaghloul *et al.*, 2020). On leitud, et loimurite arvukus sõltub raskmetallide kontsentratsioonist nende elukeskkonnas ning kui raskmetallide kontsentratsioon on kõrge, siis mõjutab see negatiivselt loimurite arvukust (Vargha *et al.*, 2002). Loimurid on tundlikud ka keskkonna pH suhtes, kus happesuse suurenedes nende arvukus väheneb (Massa *et al.*, 2023). Lisaks teistes uuringutes on järeldatud, et loimurid võivad olla bioindikaatorid õhu- ja veereostusele (Steiner, 1994). Näiteks Jakubowska-Krepska *et al.* (2018) töös võeti proove tsentraalsest reoveepuhasti



bioreaktoritest, kus varieerus hapnikutase ja toitainete kontsentratsioon. Igas reoveeproovis esines ainult üks loimuriliik, *Thulinus ruffoi*, kuid vastavalt proovile varieerus selle arvukus oluliselt. Kõige suurem loimurite arv oli kõige suurema reostusega proovides. Seega, *Thulinus ruffoi* on mõnede toksiliste kemikaalide suhtes tundetu või isegi eelistab teatud saastusega elupaiku. See tulemus viitab, et suur *T. ruffoi* arvukus võiks olla veereostuse indikaator (Jakubowska-Krepska *et al.*, 2018). Lisaks, on uuritud kogu ammoniumlämmastiku (TAN) kontsentratsiooni mõju *T. ruffoi* ellujäämisele (Sobczyk *et al.*, 2015). Vee TAN kontsentratsioon, mis on suurem kui 125 mg/L, on *T. ruffoi* jaoks toksiline ning nendes proovides ei olnud ükski loimur elus (Sobczyk *et al.*, 2015). Sellest uuringust järeldati aga, et *T. ruffoi* ei saa olla efektiivne bioindikaator vees sisalduvale TAN-ile suurtes reoveepuhastites, kuna selle liigi keskmine surmav kontsentratsioon (LC<sub>50</sub>) on umbes 5 korda suurem (52 mg/L), kui lubatud väärtus (10 mg/L) (Sobczyk *et al.*, 2015).

#### 1.4. Loimurite määramine

Loimureid määratakse enamasti morfoloogiliste tunnuste kaudu, näiteks küüniste, neelu ja kutiikula struktuuri järgi (Thorp ja Rogers, 2016). Füüsikaliste jõudude mõjul võivad loimurite küünised ümberpööruda, mis muudab liigi määramise keerulisemaks (Bingemer ja Hohberg, 2017). Suuremamahuliste tööde jaoks võib morfoloogial põhinev määramine olla aeganõudev ning liigi usaldusväärseks identifitseerimiseks võib vaja minna nii täiskasvanud loomade kui ka nende munade olemasolu (Thorp ja Rogers, 2016; Topstad *et al.*, 2021). Lisaks võib morfoloogiliste tunnuste, näiteks küüniste, kaudu määramine olla raskendatud küüniste asendi muutuste tõttu isendi mikroskopeerimiseks ettevalmistamise käigus (Bingemer ja Hohberg, 2017).

Eelnimetatud probleemide ületamiseks on viimasel kahel aastakümnel kiiresti populaarsust kogunud DNA-põhine liikide määramine – DNA-triipkoodistamine, mis põhineb organismis leiduva teatud DNA regiooni (DNA-triipkoodi) sekveneerimisel (Deiner *et al.*, 2017). Selle meetodi põhjal määramise eelduseks on, et DNA-triipkood on erinevate huvipakkuvate liikide vahel erinev. Loomarühma kuuluvate isendite DNA triipkoodistamiseks kasutatakse enamasti mitokondriaalse genoomi lõike, kuna võrreldes tuumas oleva DNA-ga on seal vähem introneid ja rekombinatsiooni (Saccone *et al.*, 1999). Loomade määramiseks on enim kasutatavaks DNA regioniks COI geen (Folmer, O *et al.*, 1999).

Kuid DNA triipkoodistamiseks kasutatakse ka teisi genoomi regioone, näiteks rRNA-d (Gao *et al.*, 2021). Iga ribosoom koosneb kahest subühikust — suurest, mis katalüüsib polüpeptiidi

sünteesi ja väikesest, mille abil toimub informatsiooni-RNA (mRNA) dekodeerimine (Wilson ja Doudna Cate, 2012). Mõlema subühiku struktuurikomponentideks on rRNA – suur päristuumsete ribosoomi subühik (60S) koosneb 25S, 5S ja 5.8 rRNA-dest ja ka umbes 53 ribosomaalsetest valkudest (Kumar ja Kumar, 2021). Ribosoomi väike subühik (40S) aga koosneb 18S rRNA molekulist, umbes 33 ribosomaalsetest valkudest (Moraleva *et al.*, 2022). Üks viisidest loimurite kui ka teiste päristuumsete tuvastamiseks on 18S rRNA geeni sekveneerimine, millel on üheksa piirkonda – V1 kuni V9 (Hadziavdic *et al.*, 2014). Kõige varieeruvamaks piirkonnaks peetakse 18S rRNA-s V4 piirkonda, mille pikkus varieerub liigiti ja on 230 kuni üle 500 aluspaari (bp) pikk (Nickrent ja Sargent, 1991). Kuid DNA-triipkoodide abil bioloogilise mitmekesisuse hindamiseks kasutatakse ka V2 ja V9 piirkondi (Hadziavdic *et al.*, 2014). Erinevaid 18S rRNA regioone (V1-V9) kasutatakse markeritena nii liigilise mitmekesisuse hindamiseks keskkonnaproovides (Choi ja Park, 2020) kui ka fülogeneetilistes analüüsides, et määrata loomade sugulust (Field *et al.*, 1988).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Antud töö käigus modifitseeriti eelnevalt avaldatud Topstad *et al.* (2021) töös PCR praimereid loimurite COI ja 18S rRNA V4 regioonide amplifitseerimiseks. Bakalaureusetöö esimene eesmärk oli hinnata modifitseeritud ja modifitseerimata praimerite efektiivsust loimurite COI ja 18S rRNA regioonide amplifitseerimiseks erinevates eDNA proovides. Samuti hinnata, mis regioon sobib rohkem loimurite tuvastamiseks. Töös kasutati eDNA-d, mis oli eraldatud teiste teadusprojektide raames, seega proovide korjamise meetodid ei olnud spetsiifiliselt just loimurite uurimiseks mõeldud. Seega, töö teine eesmärk oli uurida, kas eelnev proovide korjamise meetodid on sobilikud ka loimurite tuvastamiseks. Kolmas eesmärk oli võrrelda loimurite perekondade mitmekesisust erinevates keskkonnaproovide substraatides.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Keskkonnaproovid

Antud töös kasutati eDNA-d, mis oli eraldatud erinevatest substraatidest: vesi, setted, tolm, muld, kõdu, samblad, samblikud, seene viljakeha. Kõik töös kasutatud substraadid olid varasemalt korjatud Eestis erinevatelt aladelt. Veeproovid olid kogutud erinevatest veekogudest *FunAqua* projekti raames, proovivõtukohtad on välja toodud Lisas 1 (35 proovi). Kogutud materjali homogeeniti metallkuulide abil ning eraldati eDNA-d kasutades *MagAttract PowerSoil DNA KF* komplekti (Qiagen, USA) vastavalt tootja juhistele ning kasutades 0,25 g proovimaterjalist (Prins, 2022). Töös kasutatud mullaproovid (24 proovi) olid kogutud Tartu ümbruses erinevatelt aladelt - puude istandikud, mahajäetud põllumaad ja metsad (Lisa 2). Mullaproovide korjamise meetodid ja eDNA eraldamise meetodid on kirjeldatud Anslan *et al.*, (2021) töös. Samblike (5 proovi), sammalde (14 proovi), lehekõdu (8 proovi) ja seente viljakehade (7 proovi) proovid koguti Järvelja alalt (ringikujulise ala raadius 30 m, 58,2793 N, 27,3238 E). Sambla ja sambliku talluse (2-5 cm, välditi mullaga kokku puutuvat osa) proove koguti puidult või maapinnalt (Lisa 3). Lehekõdu proov hõlmas endas nelja kõdunevat lehte ühelt puuliigilt ning seene viljakeha proov 10 tükki ühelt lagundavalt viljakehalt. Proovid kuivatati, homogeeniti ning eDNA-d eraldati *PowerSoil DNA* komplekti (Qiagen, USA) abil kasutades 0,2 g proovimaterjalist. Tolmuproovid olid kogutud *FunHome* projekti raames, iga kodu kohta korjati neli proovi, eDNA-d eraldati *Phire Direct PCR Dilution* lüüsi puhvri abil (Thermo Scientific Inc., USA) vastavalt Adamson, 2021

bakalaureusetööle. Käesoleva bakalaureusetöö käigus segati neli iga kodu kohta eraldatud eDNA proovi üheks prooviks kokku (kokku 21 tolmuproovi; Lisa 4).

### **2.2.2. PCR praimerid**

COI geeni amplifitseerimiseks kasutati pärisuunalist BF2\_TardF ning vastassuunalist TardR praimerit; 18S rRNA geeni V4 regiooni amplifitseerimiseks kasutati 18S\_TAREuk454FW ja 18S\_TAREukREV3 praimerit (Topstad *et al.*, 2021; Tabel 1). Antud COI ja 18S rRNA praimerite eeldatav PCR-produkti pikkus on vastavalt 443 ja 384 bp. Praimerite järjestuste analüüs *OligoAnalyzer™ 3.1.* tarkvara abil (*Integrated DNA technologies*, 2017) näitas, et pärisuunalise ja vastassuunalise praimerite sulamistemperatuurid erinesid rohkem kui 10 °C võrra. Seetõttu, lisaks eelnevatele testiti kas amplifitseerimise võimekust võiks parandada modifitseeritud praimerite BF2\_TardFs ja 18S\_TAREuk454FWs versioonid, mis on praimerite 5' otsast kahe või kolme nukleotiidi võrra lühendatud (BF2\_TardF - TardR vs. BF2\_TardFs - TardR; 18S\_TAREuk454FW - 18S\_TAREukREV3 vs. 18S\_TAREuk454FWs - 18S\_TAREukREV3). Praimerite nimetused, järjestused, GC koostis, minimaalne, keskmine ja maksimaalne sulamistemperatuurid on kirjas Tabelis 1.

Erinevate DNA proovide amplifitseerimiseks kasutati unikaalselt indekseeritud (8 bp) praimerite järjestusi, mille abil toimus proovide eristamine sekveneerimisandmetes. Kõik kasutatud praimerite nimetused ja järjestused on toodud tabelis Lisa 5.

**Tabel 1.** Praimerite nimetused, järjestused, minimaalne (min.), keskmine (kesk.), maksimaalne (maks.) sulamistemperatuurid ja GC koostis (GC%). Praimerite juurde on lisatud degeneratiivsed positsioonid: N = A, C, G või T; R = G või A; Y = C või T; K = G või T; D = A, G või T; S = C või G (Wei *et al.*, 2003).

COI region					
Nimetus	Järjestus (5' - 3')	Min (°C)	Kesk. (°C)	Maks. (°C)	GC %
BF2_TardF	GCNCCNGAYATRCNTTYCC	47,5	57,1	66,8	57,5
BF2_TardFs (modifitseeritud)	CCNGAYATRCNTTYCC	40,1	49,6	59,4	52,9
TardR	GGWARAATHARAATATADAC	36,2	39,9	44,6	23,3
18S rRNA V4 region					
Nimetus	Järjestus (5' - 3')	Min (°C)	Kesk. (°C)	Maks. (°C)	GC %
18S_TAREuk454FW	CCAGCASCYGC GGTAATTCC	58,7	60,1	61,5	62,5
18S_TAREuk454FWs (modifitseeritud)	AGCASCYGC GGTAATTCC	55,3	56,9	58,5	58,3
18S_TAREukREV3	ACTTTCGTTCTTGATYRA	43,2	45,9	48,3	33,3

### 2.2.3. PCR

PCR-i reaktsioonisegu maht oli 25 µl ning igat reaktsiooni tehti kahes korduses. PCR reaktsioonisegu, kus eDNA substraatideks olid vesi, muld, kõdu, samblad, samblikud, seene viljakeha, sisaldas 17 µl deioniseeritud vett, 0,5 µl (20 µM) pärisuunalist praimeri, 0,5 µl (20 µM) vastassuunalist praimerit, 5 µl PCR segu (*HOT FirePol Blend Mastermix Ready to Load with 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5x, Solis BioDyne*, Eesti) ja 2 µl eDNA-d. Tolmu eDNA vähesuse tõttu lisati PCR reaktsiooni segusse 1 µl eDNA-d ja 18 µl deioniseeritud vett, kõik ülejäänud reagentide kogused olid samad.

COI ja 18S rRNA V4 regioonide jaoks kasutati kahte erinevat PCR programmi vastavalt Topstad *et al.*, (2021) tööle ainukese erinevusena, et käesolevas töös toimus polümeraasi aktiveerimine 15 minutit 95 °C juures (erineva polümeraasi kasutamise tõttu).

PCR programm COI regiooni jaoks:

1. Polümeraasi aktiveerimine ja esialgne DNA denaturatsioon - 15 minutit 95 °C juures
2. DNA denaturatsioon - 40 sekundit 94 °C juures
3. Praimerite seondumine DNA-le - 1 minut 48 °C juures
4. DNA süntees - 40 sekundit 72 °C juures
5. DNA süntees - 10 minutit 72 °C juures

Etapid 2-4 olid korratud 35 korda.

PCR programm 18S rRNA V4 regiooni jaoks:

1. Polümeraasi aktiveerimine ja esialgne DNA denaturatsioon - 15 minutit 95 °C juures
2. DNA denaturatsioon - 40 sekundit 94 °C juures
3. Praimerite seondumine DNA-le - 1 minut 52 °C juures
4. DNA süntees - 40 sekundit 72 °C juures
5. DNA süntees - 10 minutit 72 °C juures

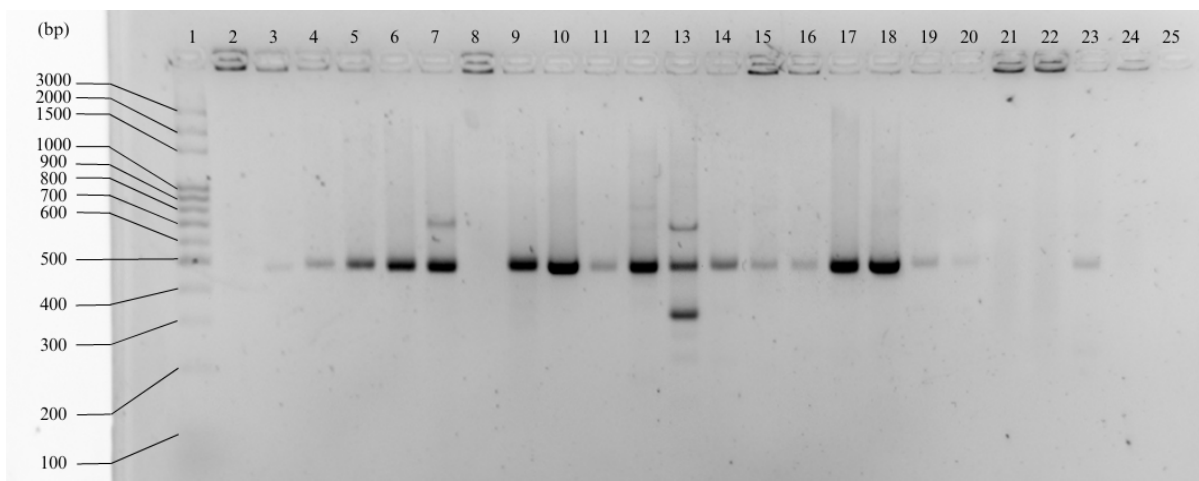
Etapid 2-4 olid korratud 25 korda.

#### **2.2.4. Geelelektroforees**

PCR-i käigus saadud produktide olemasolu kontrolliti agarosgeelelektroforeesil (1% agarosgeel). Agarosgeeli valmistamiseks kasutati 100 ml 10 korda lahjendatud TBE puhvrit (0,13M Tris (pH 7,6), 45 mM boraat, 2,5 mM EDTA), kuhu lisati 1 g agarosi ning 5 µl *Atlas ClearSight Gold DNA Stain* lahust (*Bioatlas*, Eesti) DNA visualiseerimiseks. Tardunud geelile kanti 5 µl PCR-produkti proovi kohta ning iga esimese geeli real oleva hambasse lisati suurusmarkerit (*100 bp DNA ladder*, *Solis BioDyne*, Eesti) PCR-produkti suuruse kontrollimiseks. Geelelektroforees toimus pingel 100V 25 minuti jooksul. Geelil olevaid produkte ilmutati kasutades ultravioletvalgust. Geelidest tehti pilte ning analüüsiti iga PCR-produkti olemasolu piltidel. Kui 1%-lisel agarosgeelil oli näha mitu produkti proovi kohta, siis produktide pikkused määrati 2%-lisel agarosgeelil (2 g agarosi, 100 ml 10 korda lahjendatud TBE puhvrit ning 5 µl etiidiumbromiidi alternatiivi). Geelelektroforees toimus pingel 100V 90 minuti jooksul.

### 2.2.5 PCR-produktide kogud

Loimuri DNA positiivseteks loeti need DNA proovid, kus oli PCR-produkti näha (Joonis 1). Proovide PCR-produktid segati kokku vastavalt PCR-produkti tugevusele geelidest tehtud piltidel (kui pildil oli nähtav tugev riba, siis lisati 1 µl, keskmise riba korral 5 µl ja kui riba oli hägus, siis lisati 9 µl). COI ja 18S rRNA paljundatud DNA-lõikudele tehti eraldi PCR-produktide kogud.



**Joonis 1.** Pilt 2%-lisest agarosegeelist, kus on näha PCR-i käigus amplifitseeritud COI regiooni lehekõdu, sammalde ja samblike proovidest modifitseeritud COI praimerite abil. Radades 3-7, 9-20, 23 kasutatud proove loeti loimuri DNA positiivseteks ning radades 2, 8, 21, 22, 24 kasutatud proove loeti loimuri DNA negatiivseteks. Rajas 25 oli negatiivne kontroll.

PCR-produktide kogud puhastati *FavorPrep GEL/PCR Purification Mini* komplekti (*Favorgen*, Austria) abil. Enne puhastamisega alustamist lisati pesupuhvrise 200 µl etanooli (96%) ning elueerimispuhvril soojendati termostaadis 65 °C juures 30 min. PCR-produktide kogudele lisati kolmekordne kogus FADF puhvrit. Iga saadud FADF puhvri ja PCR-produktide kogu lahusest pipeteeriti 600 µl FADF kolonnidesse ning tsentrifugeeriti 30 sekundit 11 000 g. Läbi kolonni uhitud vedelik eemaldati (DNA jäi FADF kolonni sisse) ning tegevust korrati kuni kogu lahuse ruumala oli filtreeritud. Igasse FADF kolonni lisati 750 µl pesupuhvrit ning tsentrifugeeriti 30 sekundit 11 000 g juures. Kolonni kuivatamiseks pesupuhvril toimus tsentrifugeerimine 18 000 g juures 3 minutit. FADF kolonn asetati uude 1,5 ml tuubi ning filtri keskele lisati 60 µl elueerimispuhvril. Elueerimispuhvril inkubeerimisaeg filtril oli 1 minut (toatemperatuuril), millele järgnes tsentrifugeerimine 18 000 g juures 1 minut. Vastavalt tootja juhistele kasutati *Qubit IX dsDNA HS Assay* komplekti (Thermo Fisher Scientific, Saksamaa) puhastatud PCR-produktide kogude kontsentratsioonide mõõtmiseks

*Qubit 3.0* fluoromeetriga (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Illumina sekveneerimiseks vajalik DNA kontsentratsioon on 1000 ng PCR-produktide kogu kohta. Setteproovide PCR-produktide kogude DNA kontsentratsioonid olid 115,2-177,5 ng, seega nende sekveneerimisandmeid antud töös ei kasutanud. Illumina DNA sekveneerimine teostati firmas Novogene (Suurbritannia) kasutades NovaSeq 6000 platformi (2x250 bp).

### **2.2.6. Andmeanalüüs**

Illumina sekveneerimisandmete analüüsiks kasutati *PipeCraft2* v1.0.4 (Anslan *et al.*, 2017) tarkvara. Analüüsiks valiti “*ASV workflow*” mis hõlmab DADA2 programmi (Callahan *et al.*, 2016) abil toorandmete filtreerimist, järjestuste paaride ühendamist ning kimääride (kaks või enam bioloogilist järjestust, mis on omavahel valesti seondunud) eemaldamist. Antud protsess viidi läbi vaikimisi seatud sätetega *PipeCraft2* v1.0.4 tarkvaras. Saadud DNA-markerlõigu järjestuse variandid (ASV-d) rühmitati molekulaar-taksonoomilisteks üksusteks (OTU-deks) kasutades *vsearch* v.2.18.0 (Rognes *et al.*, 2016) tarkvara. COI järjestused rühmitati 97% sarnasuse alusel (--id 0.97) ning 18S järjestused 98% sarnasuse alusel. OTU-de järjestusi võrreldi EMBL v143 andmebaasi vastu kasutades BLAST v.2.11.0+ (Camacho *et al.*, 2009) programmi.

Statistiliste analüüside ja jooniste koostamiseks kasutati R v4.3.0 (R Core Team, 2022) tarkvara pakette *ggplot2* v3.4.2 (Wickham, 2016) *vegan* v2.6.4 (Oksanen *et al.*, 2008) ja *phyloseq* v1.44.0 (McMurdie ja Holmes, 2013). Erinevate praimerite mõju loimurite järjestuste ja OTU-de arvule hinnati Kruskal-Wallis-e testiga. Antud testis peeti statistiliseks oluliseks tulemust, mille P-väärtus võrdus või oli väiksem kui 0,05.

## **2.3. Tulemused ja arutelu**

### **2.3.1. PCR**

PCR protsessi edukus (nähtav riba geelidest tehtud piltidel) vastavalt keskkonnaproovi substraadile ja kasutatud praimeripaarile on välja toodud Tabelis 2. Siinkohal võrreldi modifitseeritud ja modifitseerimata praimerite visuaalset PCR efektiivsust, statistilisi teste ei teostatud. Kuid Tabelis 2 olevatest väärtustest võiks eeldada, et süstemaatilisi olulisi erinevusi ei ole. Geelidest tehtud piltide järgi paistis, et COI praimerid olid veeproovidest DNA amplifitseerimises edukamad kui 18S rRNA praimerid (Tabel 2). Kuid siiski mõlema praimeripaari, modifitseerimata ja modifitseeritud COI praimerite korral oli veeproovidest amplifitseerimise edukus alla 50%. Setteproovidest DNA amplifitseerimiseks kõige



effektiivsemad olid modifitseeritud praimerid – COI ja 18S rRNA markerite jaoks. 18S rRNA modifitseeritud praimerite kasutamisel saadi setteproovidest kõige rohkem PCR-produkte – 17. Kasutatud praimeripaaride amplifitseerimise efektiivsus oli kõige kõrgem mullaproovides (75-100%, Tabel 2). Seevastu, kõige madalam PCR efektiivsus tuvastati tolmuproovides.

**Tabel 2.** Positiivsete proovide arv ja osakaal vastavalt kasutatud praimeripaarile ja eDNA substraadile (keskkonnaproovile).

eDNA substraat	Praimerid				eDNA proovide summa
	COI	COI (modifitseeritud)	18S rRNA	18S rRNA (modifitseeritud)	
<b>Vesi</b>	14 (42,42%)	14 (42,42%)	6 (18,18%)	8 (24,24%)	33
<b>Setted</b>	12 (34,29%)	15 (42,86%)	13 (37,14%)	17 (48,57%)	35
<b>Tolm</b>	2 (9,52%)	1 (4,76%)	3 (14,29%)	3 (14,29%)	21
<b>Muld</b>	24 (100%)	24 (100%)	23 (95,83%)	18 (75%)	24
<b>Lehekõdu</b>	4 (50%)	6 (75%)	7 (87,5%)	6 (75%)	8
<b>Samblad</b>	9 (64,29%)	9 (64,29%)	11 (78,57%)	12 (85,71%)	14
<b>Samblikud</b>	3 (75%)	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)	4
<b>Seened</b>	4 (57,14%)	6 (85,71%)	7 (100%)	4 (51,14%)	7

### 2.3.2. COI praimerid

COI praimerite andmestikust (mõlemad COI praimeripaarid) leiti kokku 2787 OTU-t, millest vaid 70 OTU-t said taksonoomilise määrangu. Ülejäänud OTU-dele ei leitud andmebaasist vastet (2349 OTU-t) või vaste oli madalate sarnasusväärtustega (368 OTU-t, mille päringjärjestuse katvus ja identsusprotsent olid alla 80%). Taksonoomilise määrangu saanud 70 OTU-st kuulus ainult üks OTU loimurite hulka, mida leiti ühes mullaproovis (ainult 2 järjestust). Ülejäänud organismid, mis esinesid proovides olid teised loomad (15 OTU-t: 12 lüljalgsed, 2 ümarussid, 1 tuvastamata loomariiki kuuluv OTU), seened (3 OTU-t), bakterid

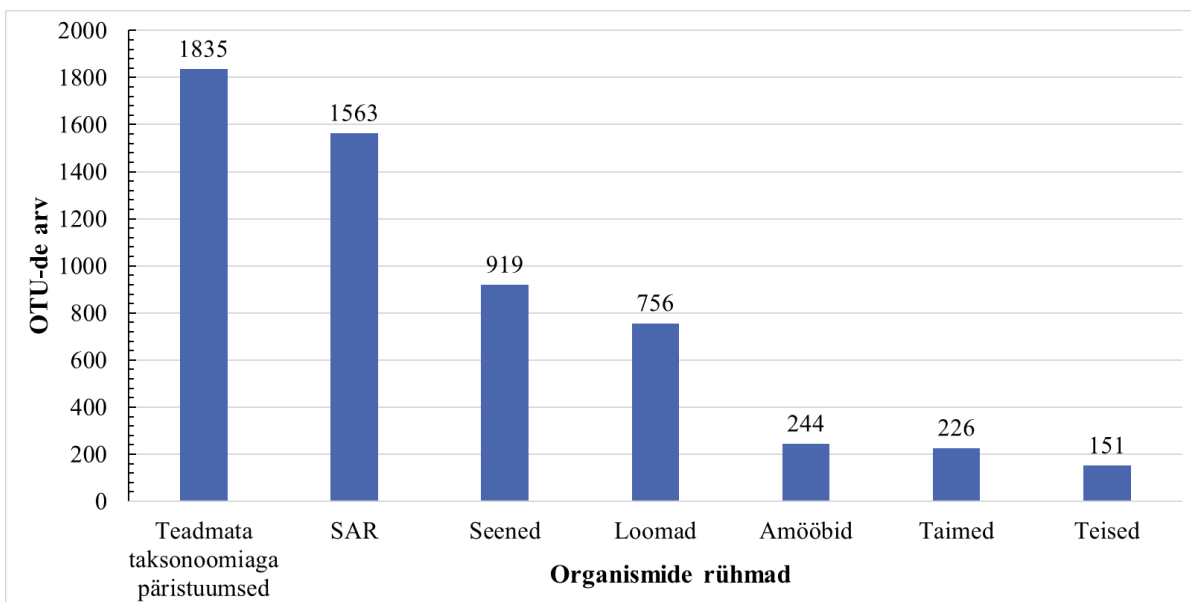
(34 OTU-t), amööbid (4 OTU-t), taimed (10 OTU-t) ja päristuumsete klaad, mis hõlmab endas *Stramenopila*, *Alveolata* ja *Rhizaria* (SAR) (Grattepanche *et al.*, 2018) (3 OTU-t).

Topstad *et al.* (2021) töös modifitseeriti universaalseid COI praimereid nii, et need kattuks paremini loimurite amplifitseeritava COI regiooniga, kuid selle käigus lisati praimeritele degeneratiivseid positsioone (N, K, Y, D) juurde. Kuigi need praimerid amplifitseerivad loimureid potentsiaalselt paremini (Topstad *et al.*, 2021), on olemuselt viimased praimerid nüüd veel universaalsemad. Samuti vastassuunalise praimeri GC koostis oli üsna madal (23,3°C), mis tõenäoliselt mõjutas praimeri termodünaamilist stabiilsust (Chuang *et al.*, 2013). Keskkonnaproovides, kus enamuse eDNA-st moodustab tõenäoliselt mikroobset päritolu DNA, võivad haruldasemad päristuumused organismid universaalsete praimeritega jääda tuvastamata COI praimerite abil, mis on kooskõlas varasema uuringuga (Echeverría-Galindo *et al.*, 2021). Antud töös, enamuse OTU-dele taksonoomiliste vastete mitteleidmine viitab sellele, et kasutatud COI praimerid on liialt universaalsed, amplifitseerides COI regiooni mitte-huvipakkuvatest organismidest või isegi COI-väliseid DNA fragmente. Viimasele viitab ka, et kuigi kasutatud COI praimerite oodatav amplifitseeritud regiooni pikkus 443 bp, on Joonisel 1 näha, et geeli seitsmendas ja kolmeteistkümnendas rajas said amplifitseeritud ka oodatust lühemad ja pikemad DNA fragmendid. Siiski on COI regioon oluline marker loimurite ja teiste loomade DNA-põhises määramises ning nende tuvastamisele universaalsete praimeritega võiks kaasa aidata sekveneerimise sügavuse tõstmine (Smith ja Peay, 2014). Antud katses oli see keskmiselt 45000 järjestust proovi kohta.

### **2.3.3. 18S rRNA V4 regiooni praimerid**

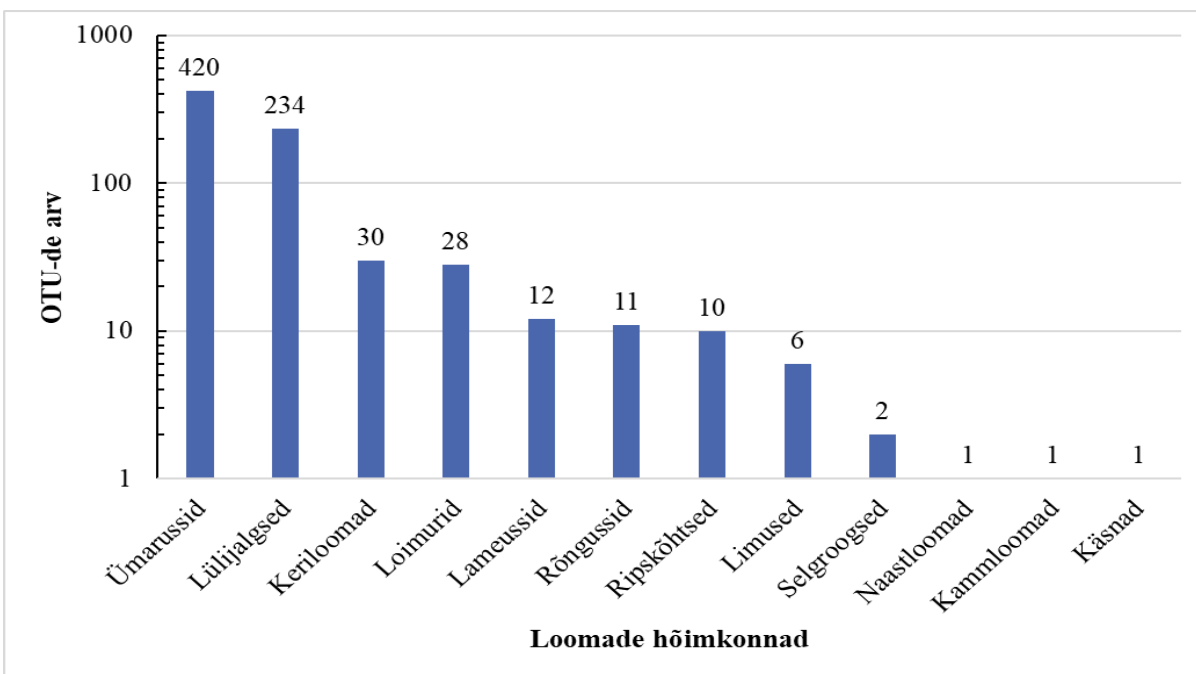
#### **2.3.3.1. Tuvastatud organismide ülevaade**

18S rRNA V4 regiooni üleüldisest andmestikust (mõlemad 18S rRNA praimeripaarid) tuvastati kokku 6706 OTU-t, millest filtreeriti välja 948 OTU-t, mille päringjärjestuse katvus ja identsuse protsent olid alla 80% ning 64 OTU-le ei leitud vastet. Proovides leiduvate organismide hulka kuulusid enamasti teadmata taksonoomiaga päristuumused (32,2%), SAR (27,4%), seened (16,1%), loomad (13,3%), amööbid (4,3%), taimed (4%), ning teised organismirühmad, mis moodustasid alla 1% identifitseeritud OTU-dest (2,7%) (Joonis 2).



**Joonis 2.** Erinevate organismirühmade OTU-de arv.

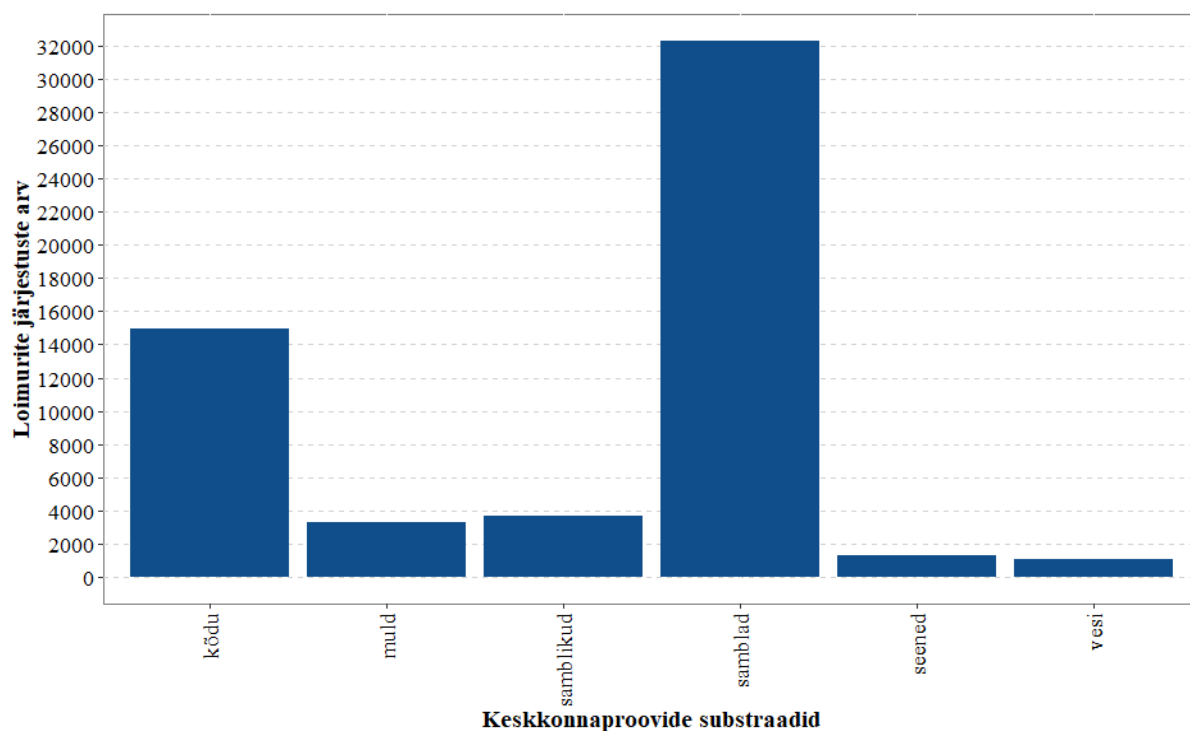
Kokku leiti 756 loomade OTU-t, millest 28 kuulusid loimurite hulka. Ülejäänud loomad olid ümarussid, lüljalgsed, keriloomad, lameussid, rõngussid, ripskõhtsed, limused, selgroogsed, naastloomad, kammloomad ja käsnad (Joonis 3). Ka Topstad *et al.* (2021) töös leiti sama praimerite abil rohkem rohkem loimureid, kui COI praimerite kasutamisel.



**Joonis 3.** Tuvastatud OTU-de arv loomade hõimkondade kaupa mõlemate 18S rRNA praimeripaaride kasutamisel.

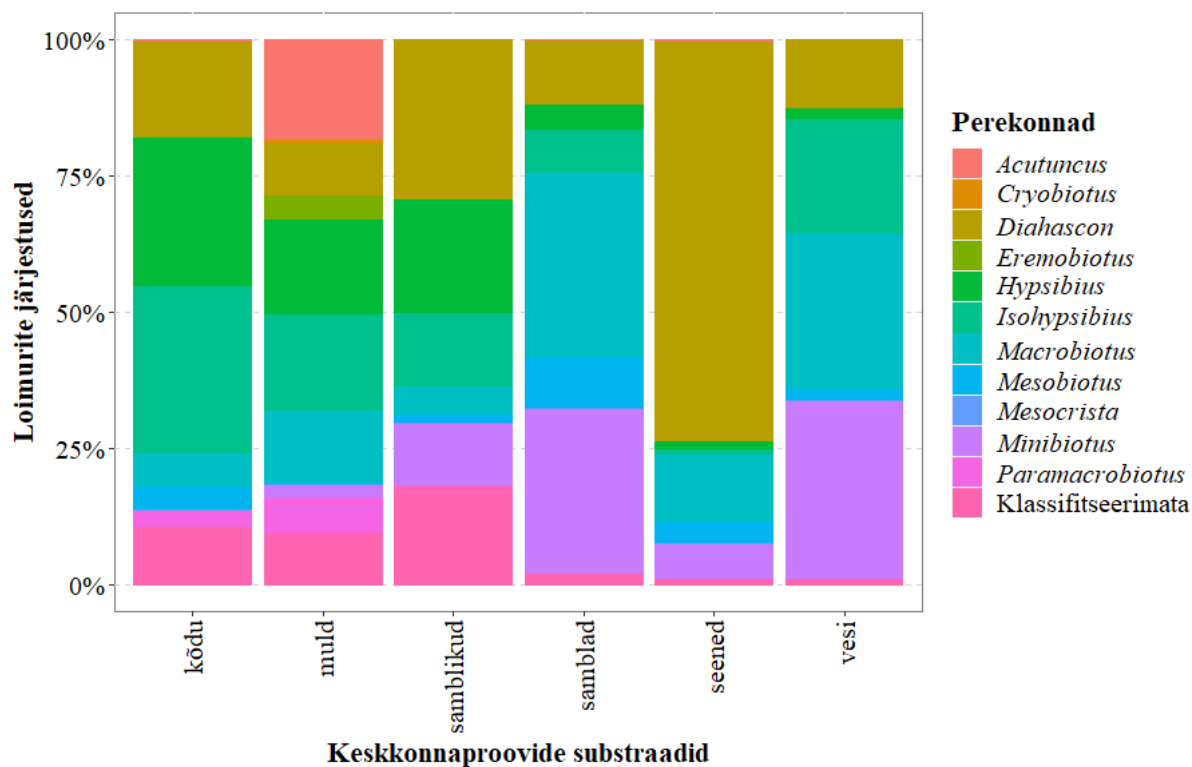
Kuigi mõni üksik tolmuproov andis positiivse PCR tulemuse (Tabel 2), ei tuvastatud seal ühtegi loimuri järjestust. See viitab, et antud tolmu kogumise meetod ei sobinud loimurite tuvastamiseks või loimurid ei eelista sellist suhteliselt kuiva tehiskeskkonda, kuna vajavad paljunemiseks vett (Jönsson ja Guidetti, 2001). Lisaks, tolmuproovide eDNA kogus antud töö jaoks oli väike ning iga PCR reaktsiooni sai lisada ainult 1 µl eDNA-d. Siinkohal ei olnud võimalik testida, kas suurema eDNA koguse lisamine võiks kaasa aidata loimurite tuvastamisele antud meetodiga kogutud tolmuproovides.

Kokku tuvastati 56705 loimuri DNA järjestust kuues erinevas substraadis. Kõige suurem loimurite DNA järjestuste arv esines samblaproovides (Joonis 4), mis on kooskõlas varasemate töödega (Meyer, 2013; Schuster ja Greven, 2007; Topstad *et al.*, 2021). Loimurid eelistavad samblaid, kuna samblade keskkond on niiske ja toitainerikas nii herbivoorsetele kui ka karnivoorsetele liikidele (Schill *et al.*, 2011). Peale tolmuproovide, tuvastati kõige vähem loimurite DNA järjestusi veeproovides. Kuna tavaliselt loimureid esineb vees palju (Majdi *et al.*, 2020), võib loimurite järjestuste vähesus olla tingitud proovide korjamise meetodikast, mis ei sobinud hästi loimurite tuvastamiseks. *FunAqua* projekti raames filtreeriti 100 ml kuni 1000 ml vett ühele filtrile, mis võib olla piisav üldise mikroobikoosluse tuvastamiseks antud veekogus, kuid mitte mikroloomade tuvastamiseks. Joonisel 4 on näha, et samblikutes olid loimurite DNA järjestuste arv madal, kuigi tavaliselt samblikutest leidub palju loimureid samade praimerite abil (Topstad *et al.*, 2021). Kuid antud töös oli analüüsitud ainult kolm samblikuproovi väiksest tallusest, mille põhjal põhjalike järeldusi teha ei saa. Näiteks Topstad *et al.* (2021) töös iga proovi pindala oli 100 cm<sup>2</sup> nii samblike, sammalde ja lehekõdu kohta, mis võimaldas koguda rohkem loimurite isendeid. Kuigi ei tohi välistada ka seda, et loimurid ei eelistanud antud samblike. Käesolevas töös kasutatud samblikuproovid olid perekonnast *Peltigera* (Lisa 3). Vähene loimurite DNA järjestuste arv samblike proovides võib olla seotud näiteks *Peltigera* erinevate liikide kasvukeskkonnaga, kuna mõned *Peltigera* liigid on kserofüütsed ning neid leidub toitainetevaestes ja kuivades kohtades (Jüriado *et al.*, 2017). Samuti mõned *Peltigera* liigid kasvavad happelises keskkonnas (Jüriado *et al.*, 2017), mida loimurid ei eelista (Massa *et al.*, 2023). Kõduproovidest saadud loimurite DNA järjestuste arv oli ligikaudu 50% väiksem võrreldes sammaldega (Joonis 4.). Kuigi ka Topstad *et al.* (2021) töös esines kõduproovides vähem loimureid, kui samblaproovides, võis antud töös vähene loimurite hulk kõduproovides olla seotud kõdunevate lehtede vähesusega proovi kohta (4 lehte).



**Joonis 4.** Loimurite järjestuste summa erinevate substraatidega keskkonnaproovides.

Kokku tuvastati 11 loimuri perekonda – *Acutuncus* (669 järjestust), *Cryobiotus* (31 järjestust), *Diahascon* (8931 järjestust), *Eremobiotus* (157 järjestust), *Hypsibius* (7087 järjestust), *Isohypsibius* (8377 järjestust), *Macrobiotus* (12994 järjestust), *Mesobiotus* (3737 järjestust), *Mesocrista* (21 järjestust), *Minibiotus* (10815 järjestust), *Paramacrobiotus* (745 järjestust). Neli OTU-t (3141 järjestust) jäi perekonna tasemele klassifitseerimata (lähedasem vaste “*unclassified Isohypsibioidea*”, identsusprotsent 97,4-100%). Kõik OTU-d kuulusid klassi *Eutardigrada*. Loimurite järjestuste arv iga keskkonnaproovide substraadis oli väga erinev. Selleks, et näidata loimurite perekondade osakaalu, on Joonisel 5 tulemused esindatud protsentides iga substraadi kohta. Lehekõdu proovides leiti 8 loimurite perekonda, samblikutes 6 perekonda ja teistes substraatides 7 perekonda. Kuigi mullaproovides esines võrdlemisi vähe loimurite amplifitseeritud 18S rRNA järjestusi, oli nendes proovides loimurite perekondade mitmekesisus kõige suurem. Mullaproovides tuvastatud loimurite liigid kuulusid 10 loimurite perekonda. See võis olla tingitud mullaproovide korjamise meetodikast, mis hõlmas proove erinevatest ökosüsteemidest (Anslan *et al.*, 2021). Lisaks, muld on iseenesest toitaineterikas ning on teada, et mõned karnivoorsed loimurite liigid toituvad ümarussidest, keda on leitud mullas (Sánchez-Moreno *et al.*, 2008) ja oli leitud rohkelt ka antud töös (Joonis 3).



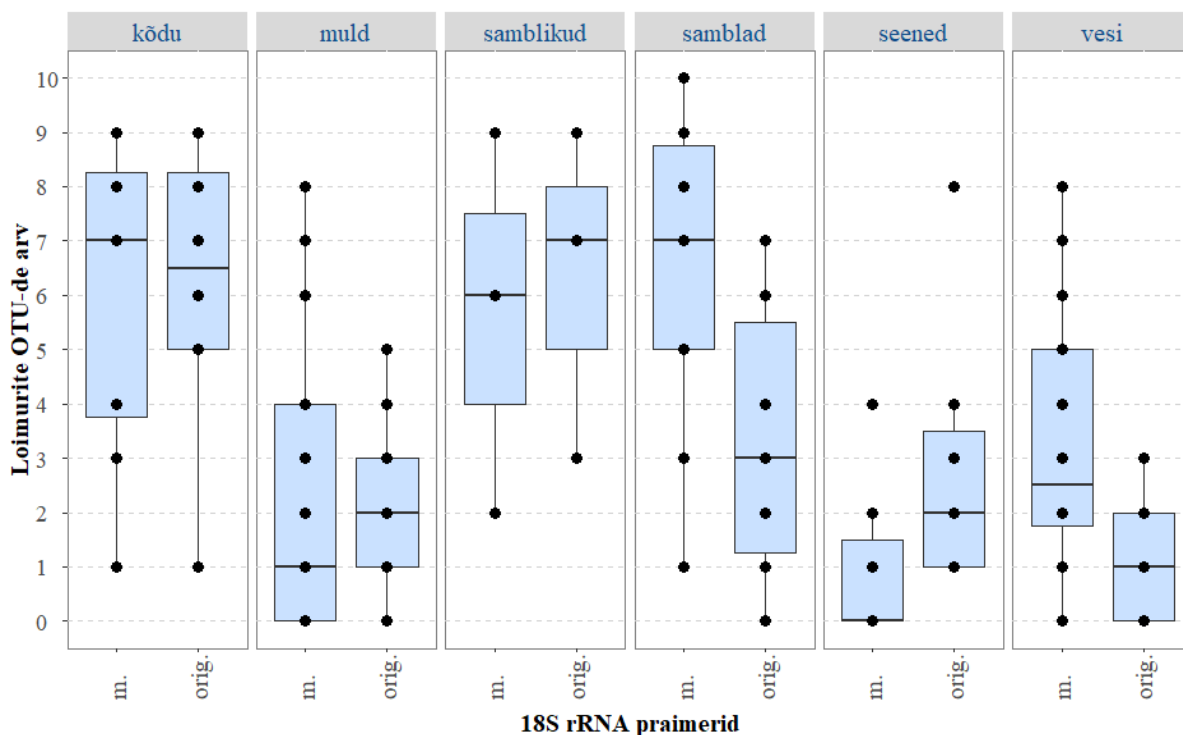
**Joonis 5.** 18S rRNA praimeritega tuvastatud loimurite perekondade DNA järjestuste osakaal keskkonnaproovide kaupa.

Antud töös kõige suurem tuvastatud loimurite järjestuste arv kuulus perekonda *Macrobiotus*. Joonisel 5 on näha, et perekond *Macrobiotus* on kõige rohkem esindatud samblaproovides, mis on kooskõlas Schuster ja Greven, (2007) tööga. Enamus *Macrobiotus* perekonna järjestustest kuulus tõenäoliselt liiki *M.hufelandi* (10235 järjestust), mis on kõige sagedamini leiduv loimuriliik üle kogu maailma (Kaczmarek ja Michalczyk, 2017). Ilmselt sellisel põhjusel *M.huefandil-e* kuuluvad järjestused esinevad peaaegu igas substraadis.

### 2.3.3.2. Erinevate praimeripaaride mõju

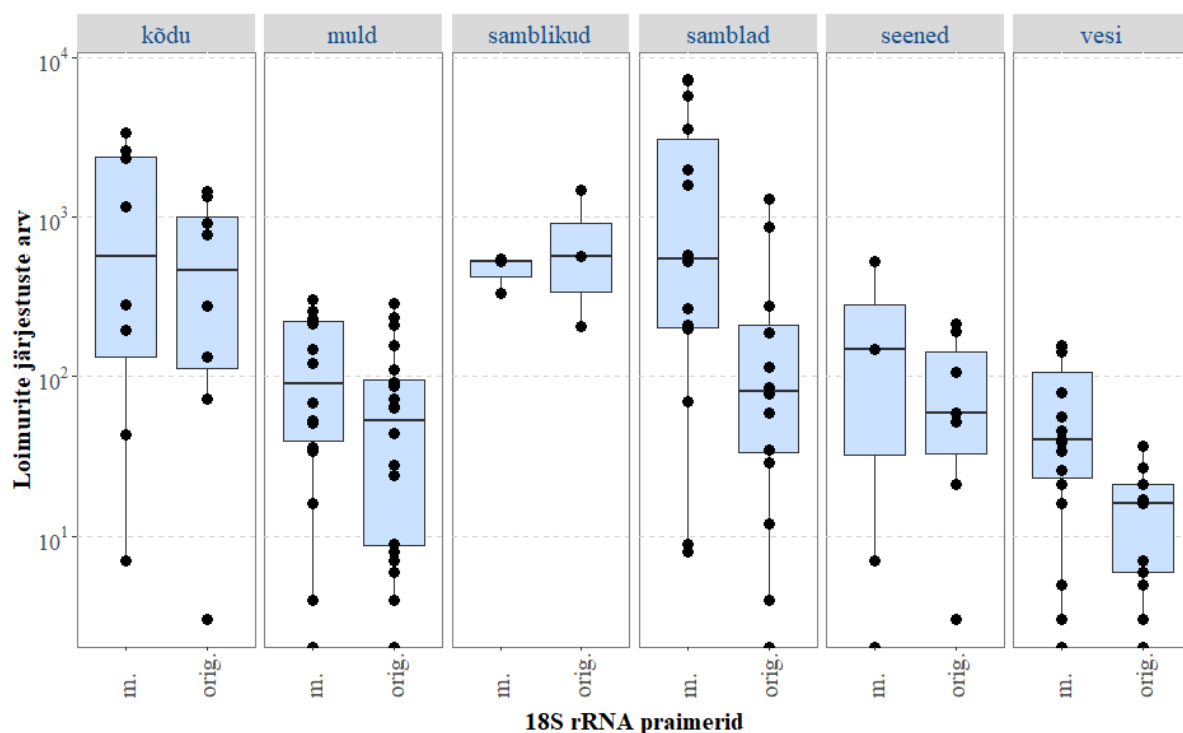
Kruskal-Wallis-e testi abil hinnati, kas leitud loimurite OTU-de (18S rRNA järjestused) arv sõltub oluliselt kasutatud praimeripaarist (modifitseerimata (Topstad *et al.*, 2021) vs. modifitseeritud (siin töös)). Analüüsil saadud P-väärtus üle kogu proovide oli 0,122, mis viidab sellele, et statistilisest olulist erinevust ei ole. Lisaks hinnati, kas esineb oluline erinevus modifitseeritud ja modifitseerimata praimerite ja loimurite järjestuse arvu vahel. Testi tulemus näitas, et üle kogu proovide ei ole erinevus statistiliselt oluline (P-väärtus = 0,087). Andmed võrreldi keskkonnaproovide substraatide kaupa ning hinnati, kas modifitseeritud praimerite abil saab leida oluliselt rohkem loimurite OTU-sid. Andmestiku visualiseerimiseks tehti karpdiagramm (Joonis 6) ning on näha, et sambla- ja veeproovides

modifitseeritud praimerite kasutamisel on loimurite OTU-de arv suurem. Iga proovi kohta tuvastatud OTU-de arvu kujundati joonistel Lisades 6 ja 7.



**Joonis 6.** Loimurite OTU-de arv erinevate praimerite kasutamisel substraatide kaupa. X-teljel on märgitud 18S rRNA praimerid, “m.” - modifitseeritud praimerid (siin töös), “orig.” - originaalsed praimerid, mis on võetud tööst Topstad *et al.* (2021). Igas proovis leitud loimurite OTU-de arv kujundab karpdiagrammil ühe musta täppi. Karpide keskmised jooned tähistavad mediaan-väärtust, karpide alumised ja ülemised otsad tähistavad vastavalt 25% ja 75% protsentiile.

Substraatide kaupa hinnati ka, kas erinevat tüüpi praimerite kasutamisel on mõju tuvastatud loimurite järjestuste arvule. Andmete kujundamiseks koostati karpdiagramm (Joonis 7), kus on näha, et modifitseeritud praimerite kasutamisel saadi rohkem loimurite järjestusi keskkonnaproovides, kus substraatideks olid kõdu, muld, samblad, seemed ja vesi.



**Joonis 7.** Loimurite sekventside arv erinevate praimerite kasutamisel substraatide kaupa. x-teljel on märgitud 18S rRNA praimerid, “m.” - modifitseeritud praimerid, “orig.” - originaalsed praimerid, mis on võetud tööst Topstad *et al.* (2021). Igas proovis leitud loimurite järjestuste arv kujundab karpdiagrammil ühe musta täppi. Karpide keskmised jooned tähistavad mediaan-väärtust, karpide alumised ja ülemised otsad tähistavad vastavalt 25% ja 75% protsentiile.

Kruskal-Wallis-e testi teostati ka praimerite efektiivsuse testimiseks erinevates substraatides. Testi tulemused on välja toodud Tabelis 3. Test näitas, et sambla- ja veeproovides on oluline erinevus loimuri järjestuste ja OTU-de arvus erinevate praimerite kasutamisel ( $P$ -väärtus  $< 0,05$ ). Testi tulemused kinnitavad, et modifitseeritud praimerite kasutamisega tuvastati keskmiselt rohkem loimurite järjestusi ning sellest tulenevalt ka OTU-si. Proovides, kus substraatideks olid lehekõdu, muld, samblikud ja seemed olulist erinevust OTU-de ja loimurite järjestuste erinevate praimerite kasutamisel ei olnud. Kuid samblike ( $n = 3$ ), kõdu ( $n = 8$ ), seente ( $n = 6$ ) proovide arv oli analüüsidest suhteliselt väike ning seega ei saa siinkohal väikese valimi tõttu olulisi järeldusi teha.



**Tabel 3.** Kruskal-Wallis testi tulemusel saadud P-väärtused modifitseeritud ja originaalsete praimerite efektiivsuse testimiseks. \* - tähistab P-väärtust < 0,05.

Substraat	P-väärtused	
	Loimurite järjestuste arv	OTU-de arv
Kõdu	0,462	0,915
Muld	0,553	0,797
Samblikud	0,513	0,658
<b>Samblad</b>	<b>0,010*</b>	<b>0,013*</b>
Seened	0,137	0,067
<b>Vesi</b>	<b>0,001*</b>	<b>0,002*</b>

Viidi läbi ka permutatsioonilist mitmemõõtmelist dispersioonanalüüsi (PERMANOVA) loimurite koosluse analüüsi eesmärgil. Uuriti, kas modifitseeritud või originaalsete praimerite kasutamine mõjutab saadud loimurite kooslust läbi kogu proovide. Selgus, et P-väärtus on 0,048, mis viitab, et kasutatud praimerid mõjutasid tuvastatud loimurite OTU-de kooslust. R<sup>2</sup> väärtus oli aga ainult 0,0165, mis tähendab, et tuvastatud mõju on suhteliselt nõrk. Loimurite koosluste võrdlus paarikaupa PERMANOVA-ga (Tabel 4) näitas, et substraatide kaupa praimeripaari olulist mõju ei tuvastatud. Võrreldes omavahel saadud P-väärtusi (Tabel 4.) võib näha, et erinevate praimerite paaride koosluste võrdluses on kõige väiksem P-väärtus veeproovides. Modifitseeritud praimerite abil tuvastati 9 unikaalset OTU-t mida modifitseerimata praimerid ei tuvastanud. Modifitseerimata praimerid aga tuvastasid 4 unikaalset OTU-t. OTU-de arv, mida tuvastasid nii modifitseeritud, kuid ka modifitseerimata praimerid oli 5, mis moodustas 27,78 % kogu tuvastatud OTU-de arvust ning kuna see on võrdlemisi väike osa, peegeldas seda ka väiksem P-väärtus. Teistes substraatides praimerite paaride võrdluses, kus P-väärtus oli suurem, ühisosa (nii modifitseeritud kui ka modifitseerimata praimerite abil saadud OTU-de arv) oli suurem – 50-70% kogu tuvastatud OTU-dest iga substraadi kohta.

**Tabel 4.** Keskonnaproovide paarikaupa PERMANOVA analüüs, modifitseerimata (“orig.”) ja modifitseeritud (“m”) praimerite kaudu tuvastatud loimurite OTU-de võrdlus. Paarikaupa PERMANOVA tulemustest on samblikeproovid ka seente viljakehade proovid väikese valimi tõttu välja arvatud.

Võrdlus	P-väärtus
orig.muld ja m.muld	0,562
orig.kõdu ja m.kõdu	0,4889
orig.sammal ja m.sammal	0,596
orig.vesi ja m.vesi	0,070

## KOKKUVÕTE

Loimurid on mikroloomad, kes on võimelised jääma ellu äärmuslikes tingimustes. Nende määramine mikroskoobiga morfoloogiliste tunnuste järgi on aeganõudev, kuna on rida tegureid, mis seda raskendavad. Selleks, et lihtsustada liikide määramist kasutatakse DNA-triipkoodistamist, mis põhineb teatud DNA regiooni sekveneerimisel, mis peab olema erinev liikide vahel. Loimurite DNA-põhiseks määramiseks saab kasutada COI ja 18S rRNA V4 regioone. Antud bakalaureusetöö esimene eesmärk oli hinnata, mis PCR praimerid sobivad rohkem COI ja 18S rRNA V4 regioonide amplifitseerimiseks erinevates eDNA proovides ning mis regioon sobib rohkem loimurite tuvastamiseks. Töös kasutati nelja praimeripaari – COI, 18S rRNA modifitseerimata praimerid, mis olid võetud Topstad *et al.* (2021) tööst ning ka nende praimerite modifitseeritud versioonid. COI praimerite kasutamisel leiti ainult 1 loimuri OTU, kuid 18S rRNA praimerite kasutamisel leiti rohkem OTU-sid (28). Modifitseeritud praimerite kasutamine keskkonnaproovides, kus substraatideks olid vesi ja samblad, aitas tuvastada keskmiselt rohkem loimurite OTU-si (Joonis 7; Tabel 3), kuid antud töös ei leitud, et kasutatud praimeripaaril (modifitseeritud vs. modifitseerimata) oleks oluline mõju tuvastatud loimurite kooslustele. Töös kasutatud eDNA oli eelnevalt eraldatud teiste teadusprojektide raames, seega proovide korjamise meetodid ei olnud mõeldud just loimurite uurimise eesmärgiks. Töö teine eesmärk oli uurida, kas eelnev proovide korjamise meetodid on sobilikud ka loimurite tuvastamiseks. Loimureid tuvastati proovides, kus substraatideks olid lehekõdu, samblikud, samblad, muld, vesi ja seemned. Ainuke substraat, millest loimurite OTU-sid ei ole tuvastatud, oli tolm. Kolmas eesmärk oli võrrelda perekondade mitmekesisust erinevates substraatides. Selgus, et kõige mitmekesisemad eDNA proovid loimurite perekondade poolest olid mullaproovid ja kõige vähem perekondi tuvastati samblike proovides.

Käesoleva töö kõige olulisem järeldus on see, et 18S rRNA V4 regioon sobib paremini loimurite tuvastamiseks eDNA-s; lisaks, käesolevas töös modifitseeritud 18S rRNA praimeripaar võib paremat amplifitseerimistulemust näidata. Samuti tulemustest järeldati, et olemasolevaid eDNA kogusi on võimalik kasutada edasiseks loimurite koosluste uurimiseks erinevates keskkondades.

## Detection of tardigrades in environmental DNA samples

Natalia Sirenko

### Resümee

Tardigrades are a phylum of micro-animals that are found almost everywhere on Earth. They are highly resilient and have an ability to survive in various extreme conditions. Tardigrades use different forms of cryptobiosis as a primary defense mechanism, but certain tardigrade species are resilient in their active state probably due to their effective DNA repair mechanisms. Studying tardigrades genetics is crucial for numerous reasons. For instance, evidence suggests that insertion of tardigrades genes into both humans and plant cells can enhance their resistance to ionizing radiation. Despite tardigrades ability to survive in extreme environmental conditions, low pH, presence of certain chemicals can negatively affect their population. Consequently, tardigrades have been proposed to be efficient bioindicators, as their species composition and population densities provide information about the overall condition of an ecosystem.

Tardigrades are usually identified by morphological characteristics such as claws, buccal tube and cuticle structure. Under the influence of physical forces or during specimen preparation for microscopy, claws can become reversed, which makes identification challenging and time-consuming. DNA-based species identification or DNA barcoding helps to overcome difficulties mentioned above. DNA barcoding is based on sequencing of a DNA region that differs among species. For the identification of tardigrades, COI and 18S rRNA V4 regions are used. In the following study, the effectiveness of two types of PCR primers (presented in Topstad *et al.* (2021) article and modified in this study) for tardigrade 18S rRNA and COI regions amplification were compared. Using PCR primers for the COI region, only one tardigrade OTU was found, whereas using 18S rRNA primers 28 tardigrade OTU-s were identified. The modified versions of 18S rRNA primers amplified tardigrade 18S rRNA region more efficiently in water and moss samples, as indicated by the increased number of tardigrade OTU-s. Environmental DNA used in this study had been previously extracted as part of other scientific projects, so sampling methods were not tardigrade-specific. Tardigrades OTU-s were found in six substrates: leaf litter, lichen, moss, water, fungi and soil. Dust was the only substrate, where no tardigrades OTU-s were detected. Furthermore, this

study focused on assessing genus richness in eDNA samples. The highest number of tardigrade genera (10) was found in soil samples and the lowest (6) in lichen samples.

In conclusion, the 18S rRNA V4 region is more suitable for the detection of tardigrades and modified PCR primers are more suitable for amplifying this region in water and moss samples. Additionally, it was found that the sampling method does not need to be tardigrade-specific in order to detect tardigrades in samples.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Adamson, L. (2021). *Kodutolmus leiduvate mikroorganismide mitmekesisus ja neid mõjutavad tegurid. Bakalaureusetöö*. Tartu Ülikool, geenitehnoloogia õppekava.
- Anslan, S., Bahram, M., Hiiesalu, I., ja Tedersoo, L. (2017). PipeCraft: Flexible open-source toolkit for bioinformatics analysis of custom high-throughput amplicon sequencing data. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e234–e240.
- Anslan, S., Mikryukov, V., Armolaitis, K., Ankuda, J., Lazdina, D., Makovskis, K., Vesterdal, L., Schmidt, I. K., ja Tedersoo, L. (2021). Highly comparable metabarcoding results from MGI-Tech and Illumina sequencing platforms. *PeerJ*, 9, e12254.
- Barrett, G. W., ja Kimmel, R. G. (1972). Effects of DDT on the Density and Diversity of Tardigrades. " *Proceedings of the Iowa Academy of Science*, 78(3–4), 41–42.
- Bingemer, J., ja Hohberg, K. (2017). An illustrated identification key to the eutardigrade species (Tardigrada, Eutardigrada) presently known from European soils. *Soil Organisms*, 89(3), 127–149.
- Boothby, T. C., Tapia, H., Brozena, A. H., Piszkiwicz, S., Smith, A. E., Giovannini, I., Rebecchi, L., Pielak, G. J., Koshland, D., ja Goldstein, B. (2017). Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. *Molecular Cell*, 65(6), 975–984.e5.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., ja Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., ja Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421.
- Chavez, C., Cruz-Becerra, G., Fei, J., Kassavetis, G. A., ja Kadonaga, J. T. (2019). The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects DNA from hydroxyl radicals. *ELife*, 8, e47682.
- Choi, J., ja Park, J. S. (2020). Comparative analyses of the V4 and V9 regions of 18S rDNA for the extant eukaryotic community using the Illumina platform. *Scientific Reports*, 10(1), 6519.
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., ja Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541–1549.
- Clegg, J. S. (2001). Cryptobiosis—A peculiar state of biological organization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128(4), 613–624.
- Degma, P., Bertolani, R., ja Guidetti, R. (2023). *Actual checklist of Tardigrada species*.
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., Vere, N., Pfrender, M. E., ja Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895.
- Echeverría-Galindo, P., Anslan, S., Frenzel, P., Künzel, S., Vences, M., Pérez, L., Börner, N., Kang, W., Schwarz, A., Wang, J., Peng, P., Zhu, L., ja Schwalb, A. (2021). High-throughput identification of non-marine Ostracoda from the Tibetan Plateau: Evaluating the success of various primers on sedimentary DNA samples.

- Environmental DNA*, 3(5), 982–996.
- Field, K. G., Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Ghiselin, M. T., Raff, E. C., Pace, N. R., ja Raff, R. A. (1988). Molecular Phylogeny of the Animal Kingdom. *Science*, 239(4841), 748–753.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., ja Vrijenhoek, R. (1999). *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*.
- Gao, B., Chi, L., Zhu, Y., Shi, X., Tu, P., Li, B., Yin, J., Gao, N., Shen, W., ja Schnabl, B. (2021). An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome Studies. *Biomolecules*, 11(4), 530.
- Grattepanche, J., Walker, L. M., Ott, B. M., Paim Pinto, D. L., Delwiche, C. F., Lane, C. E., ja Katz, L. A. (2018). Microbial Diversity in the Eukaryotic SAR Clade: Illuminating the Darkness Between Morphology and Molecular Data. *BioEssays*, 40(4), 1700198.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., ja Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. *PLoS ONE*, 9(2), e87624.
- Hashimoto, T., Horikawa, D. D., Saito, Y., Kuwahara, H., Kozuka-Hata, H., Shin-I, T., Minakuchi, Y., Ohishi, K., Motoyama, A., Aizu, T., Enomoto, A., Kondo, K., Tanaka, S., Hara, Y., Koshikawa, S., Sagara, H., Miura, T., Yokobori, S., Miyagawa, K., ... Kunieda, T. (2016). Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature Communications*, 7(1), 12808.
- Hengherr, S., Heyer, A. G., Köhler, H.-R., ja Schill, R. O. (2008). Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades - evidence for divergence in responses to dehydration: Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades. *FEBS Journal*, 275(2), 281–288.
- Hengherr, S., Worland, M. R., Reuner, A., Brümmer, F., ja Schill, R. O. (2009). High-Temperature Tolerance in Anhydrobiotic Tardigrades Is Limited by Glass Transition. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(6), 749–755.
- Jakubowska-Krepska, N., Gołdyn, B., Krzemińska-Wowk, P., ja Kaczmarek, Ł. (2018). Tardigrades as potential bioindicators in biological wastewater treatment plants. *European Journal of Ecology*, 4(2), Article 2.
- Jönsson, K. I. (2019). Radiation Tolerance in Tardigrades: Current Knowledge and Potential Applications in Medicine. *Cancers*, 11(9), 1333.
- Jönsson, K. I., ja Bertolani, R. (2001). Facts and fiction about long-term survival in tardigrades. *Journal of Zoology*, 255(1), 121–123.
- Jönsson, K. I., ja Guidetti, R. (2001). Effects of Methyl Bromide Fumigation on Anhydrobiotic Micrometazoans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50(1), 72–75.
- Jönsson, K. I., Rabbow, E., Schill, R. O., Harms-Ringdahl, M., ja Rettberg, P. (2008). Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology*, 18(17), R729–R731.
- Jüriado, I., Kaasalainen, U., ja Rikkinen, J. (2017). Specialist taxa restricted to threatened habitats contribute significantly to the regional diversity of Peltigera (Lecanoromycetes, Ascomycota) in Estonia. *Fungal Ecology*, 30, 76–87.

- Kaczmarek, Ł. (2021). Tardigrada: An Emerging Animal Model to Study the Endoplasmic Reticulum Stress Response to Environmental Extremes. L. B. Agellon ja M. Michalak (Toim), *Cellular Biology of the Endoplasmic Reticulum* (lk 305–327). Springer International Publishing.
- Kaczmarek, Ł., ja Michalczyk, Ł. (2017). The *Macrobotus hufelandi* group (Tardigrada) revisited. *Zootaxa*, 4363(1), 101.
- Keilin. (1959). The Leeuwenhoek Lecture - The problem of anabiosis or latent life: History and current concept. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 150(939), 149–191.
- Kirke, J., Jin, X.-L., ja Zhang, X.-H. (2020). Expression of a Tardigrade Dsup Gene Enhances Genome Protection in Plants. *Molecular Biotechnology*, 62(11–12), 563–571.
- Kumar, J., ja Kumar, V. (2021). Ribosome proteins—Their balanced production. *Emerging Concepts in Ribosome Structure, Biogenesis, and Function* (lk 47–87). Elsevier.
- Majdi, N., Schmid-Araya, J. M., ja Traunspurger, W. (2020). Preface: Patterns and processes of meiofauna in freshwater ecosystems. *Hydrobiologia*, 847(12), 2587–2595.
- Massa, E., Rebecchi, L., ja Guidetti, R. (2023). Effects of synthetic acid rain and organic and inorganic acids on survival and CaCO<sub>3</sub> piercing stylets in tardigrades. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, jez.2701.
- McMurdie, P. J., ja Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217.
- Meglitsch, P. A., ja Schram, F. R. (1991). *Invertebrate Zoology* (3. tr). Oxford University Press.
- Meyer, H. A. (2013). Terrestrial and freshwater Tardigrada of the Americas. *Zootaxa*, 3747(1), 1.
- Mínguez-Toral, M., Cuevas-Zuviría, B., Garrido-Arandia, M., ja Pacios, L. F. (2020). A computational structural study on the DNA-protecting role of the tardigrade-unique Dsup protein. *Scientific Reports*, 10(1), 13424.
- Møbjerg, N., Halberg, K. A., Jørgensen, A., Persson, D., Bjørn, M., Ramløv, H., ja Kristensen, R. M. (2011). Survival in extreme environments – on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiologica*, 202(3), 409–420.
- Moraleva, A. A., Deryabin, A. S., Rubtsov, Y. P., Rubtsova, M. P., ja Dontsova, O. A. (2022). Eukaryotic Ribosome Biogenesis: The 40S Subunit. *Acta Naturae*, 14(1), 14–30.
- Nelson, D. R. (2002). Current Status of the Tardigrada: Evolution and Ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 652–659.
- Nickrent, D. L., ja Sargent, M. L. (1991). An overview of the secondary structure of the V4 region of eukaryotic small-subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 19(2), 227–235.
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., ja Wagner, H. (2008). *vegan: Community Ecology Package (R package version 1.15-1)*.
- Ono, M., Takeuchi, N., ja Zawierucha, K. (2022). Description of a new species of Tardigrada *Hypsibius nivalis* sp. Nov. And new phylogenetic line in Hypsibiidae from snow ecosystem in Japan. *Scientific Reports*, 12, 14995.
- Parmar, T. K., Rawtani, D., ja Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: The natural indicator of



- environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 110–118.
- Prins, V. (2022). *Veeseenud ja nende mitmekesisus Eesti veekogude setetes. Bakalaureusetöö.* Tartu Ülikool, bioloogia ja elustiku kaitse õppekava.
- Ramløv, H., ja Westh, P. (2001). Cryptobiosis in the Eutardigrade Adorybiotus (Richtersius) coronifer: Tolerance to Alcohols, Temperature and de novo Protein Synthesis. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 240(3–4), 517–523.
- Rebecchi, L., Altiero, T., ja Guidetti, R. (2007). Anhydrobiosis: The extreme limit of desiccation tolerance. *Invertebrate Survival Journal*, 4.
- Rebecchi, L., Cesari, M., Altiero, T., Frigieri, A., ja Guidetti, R. (2009). Survival and DNA degradation in anhydrobiotic tardigrades. *Journal of Experimental Biology*, 212(24), 4033–4039.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., ja Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., ja Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195–209.
- Sánchez-Moreno, S., Ferris, H., ja Guil, N. (2008). Role of tardigrades in the suppressive service of a soil food web. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 124(3–4), 187–192.
- Schill, R. O., Jönsson, K. I., Pfannkuchen, M., ja Brümmer, F. (2011). Food of tardigrades: A case study to understand food choice, intake and digestion. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49(s1), 66–70.
- Schuster, R., ja Greven, H. (2007). A long-term study of population dynamics of tardigrades in the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. *Journal of Limnology*, 66(1s), 141.
- Smith, D. P., ja Peay, K. G. (2014). Sequence Depth, Not PCR Replication, Improves Ecological Inference from Next Generation DNA Sequencing. *PLoS ONE*, 9(2), e90234.
- Sobczyk, M., Michno, K., Kosztyła, P., Stec, D., ja Michalczyk, Ł. (2015). Tolerance to Ammonia of *Thulinus ruffoi* (Bertolani, 1981), a Tardigrade Isolated from a Sewage Treatment Plant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 95(6), 721–727.
- Steiner, W. A. (1994). The influence of air pollution on moss-dwelling animals: 1. Methodology and composition of flora and fauna. *Revue suisse de zoologie.*, 101, 533–556.
- Zaghloul, A., Saber, M., Gadow, S., ja Awad, F. (2020). Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 127.
- Thorp, J. H., ja Rogers, D. C. (2016). *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates* (4. tr, Kd 2). Elsevier.
- Topstad, L., Guidetti, R., Majaneva, M., ja Ekrem, T. (2021). Multi-marker DNA metabarcoding reflects tardigrade diversity in different habitats. *Genome*, 64(3), 217–231.
- Vargha, B., Ötvös, E., ja Tuba, Z. (2002). Investigations on Ecological Effects of Heavy Metal Pollution in Hungary by Moss-Dwelling Water Bears (Tardigrada), as Bioindicators.

- Annals of Agriculture and Environmental Medicine*, 9, 141–146.
- Wei, X., Kuhn, D. N., ja Giri Narasimhan. (2003). Degenerate primer design via clustering. *Computational Systems Bioinformatics. CSB2003. Proceedings of the 2003 IEEE Bioinformatics Conference. CSB2003*, 75–83.
- Welnicz, W., Grohme, M. A., Kaczmarek, Ł., Schill, R. O., ja Frohme, M. (2011). Anhydrobiosis in tardigrades—The last decade. *Journal of Insect Physiology*, 57(5), 577–583.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (2nd ed. 2016). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Wilson, D. N., ja Doudna Cate, J. H. (2012). The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), a011536–a011536.

## KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

Integrated DNA technologies (2017). “OligoAnalyzer™ 3.1”. Kasutatud: 25.04.2023.  
<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>

R Core Team (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R  
Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Kasutatud: 01.05.2023.

<https://www.R-project.org/>.

## LISAD

**Lisa 1.** Vee- ja setteproovide koodid ja proovivõtukohad (korjatud *FunAqua* projekti raames).

<b>Proovi kood</b>	<b>Veekogu</b>	<b>Pikkuskraad</b>	<b>Laiuskraad</b>
<b>W0020</b>	Ulge paadikanal	26,01209	58,40601
<b>W0021</b>	Palojärv	26,91431	58,08302
<b>W0022</b>	Pangodi järv	26,57524	58,19153
<b>W0024</b>	Ülemiste järv	24,73486	59,3975
<b>W0026</b>	Tambre järv	24,59077	59,40081
<b>W0027</b>	Keila juga (Keila jõgi)	24,29544725	59,39427325
<b>W0028</b>	Pääsküla parditiik	24,67575	59,36705
<b>W0029</b>	Rätsepa järv	24,7505	59,3347
<b>W0030</b>	Pirita jõgi	24,83334	59,46494
<b>W0037</b>	Eerika tiik	26,66319	58,36708
<b>W0038</b>	Luke vanajärv	26,57513	58,24381
<b>W0039</b>	Rõuge Suurjärv	26,91888	57,72922
<b>W0041</b>	Mooste järv	27,18492	58,15816
<b>W0056</b>	Kääriku järv	26,39872	58,00109
<b>W0057</b>	Rummu Idakarjäär	24,19329	59,22599
<b>W0058</b>	Harku järv	24,63038	59,41109
<b>W0059</b>	Elva jõgi	26,45882	58,345066
<b>W0061</b>	Võhandu jõgi	27,176277	57,91511
<b>W0062</b>	Kaali järv	22,66935	58,37259
<b>W0064</b>	Kangruaadu järv	23,63774	58,57067
<b>W0065</b>	Paadrema jõgi	23,89251	58,52705
<b>W0066</b>	Tatra jõgi	26,67931	58,25459
<b>W0067</b>	Haage järv	26,60436	58,3508
<b>W0075</b>	Akste järv	27,05027	58,16707
<b>W0078</b>	Leedikõrve jõgi	25,70541	59,46673
<b>W0079</b>	Löwenruh pargi tiik	24,69559	59,41609
<b>W0080</b>	Ilmatsalu kalatiik	26,54938	58,38749
<b>W0081</b>	Emajõgi	26,70452	58,39358
<b>W0085</b>	Elistvere järv	26,6925	58,5784
<b>W0086</b>	Kaliküla karjäär	26,4733	59,5093
<b>W0088</b>	Aru-Lõuna lubjakivikarjäär	26,5064	59,4548
<b>W0089</b>	Kunda jõgi	25,5103	59,4475
<b>W0090</b>	Klooga järv	24,24094	59,31204
<b>W0092</b>	Uhtjärv	26,5848	57,89135
<b>W0093</b>	Jaaniraotu talu kalatiik	26,93804	57,72474

**Lisa 2.** Mullaproovide koodid ja proovivõtukohtad (Anslan *et al.* 2021).

<b>Proovi kood</b>	<b>Laiuskraad</b>	<b>Pikkuskraad</b>
<b>G5301</b>	58,25106	26,83037
<b>G5310</b>	58,26547	26,81679
<b>G5318</b>	58,25987	26,78773
<b>G5321</b>	58,24651	26,79289
<b>G5323</b>	58,24711	26,79445
<b>G5327</b>	58,21164	26,78361
<b>G5329</b>	58,23945	26,74333
<b>G5331</b>	58,25934	26,74165
<b>G5333</b>	58,24628	26,68778
<b>G5338</b>	58,30487	26,71083
<b>G5340</b>	58,22182	26,67327
<b>G5341</b>	58,23769	26,68454
<b>G5342</b>	58,23101	26,67576
<b>G5352</b>	58,23216	26,66718
<b>G5365</b>	58,30094	26,58816
<b>G5367</b>	58,3409	26,6735
<b>G5382</b>	58,32725	26,69521
<b>G5388</b>	58,34417	26,69012
<b>G5389</b>	58,34083	26,68641
<b>G5390</b>	58,46917	26,73208
<b>G5392</b>	58,45174	26,71531

**Lisa 3.** Samblike, sammalde, lehekõdu ja seente viljakehade proovid (avaldamata artikkel).

<b>Proovi kood</b>	<b>Substraat</b>	<b>Liik</b>
TUE127632	kõdu	haab
TUE127628	kõdu	kask
TUE127631	kõdu	kuusk
TUE127638	kõdu	kuusk
TUE127635	kõdu	pärn
TUE127637	kõdu	pärn
TUE127627	kõdu	vaher
TUE127639	kõdu	vaher
TUE127672	samblik	<i>Peltigera</i>
TUE127676	samblik	<i>Peltigera</i>
TUE127680	samblik	<i>Peltigera</i>
TUE127681	samblik	<i>Peltigera</i>
TUE127682	sammal	-
TUE127683	sammal	-
TUE127684	sammal	-
TUE127685	sammal	-
TUE127686	sammal	-
TUE127687	sammal	-
TUE127688	sammal	-
TUE127689	sammal	-
TUE127690	sammal	-
TUE127691	sammal	-
TUE127692	sammal	-
TUE127693	sammal	-
TUE127694	sammal	-
TUE127695	sammal	-
TUE127697	viljakeha	kännupess
TUE127708	viljakeha	kännupess
TUE127706	viljakeha	roosa pess
TUE127707	viljakeha	roosa pess
TUE127702	viljakeha	tõrvis
TUE127704	viljakeha	tõrvis
TUE127696	viljakeha	tuletael

**Lisa 4.** Tolmuproovide koodid ka proovivõtukoht (kogutud *FunHome* projekti raames).

<b>Kood</b>	<b>Proovivõtukoht</b>	<b>Laiuskraad</b>	<b>Pikkuskraad</b>
<b>D0024</b>	Suur Väin, Tõll	58,5749	23,44981
<b>D0030</b>	Põlva: Lao	58,0682	27,09193
<b>D0031</b>	Lutsu	58,0423	27,1491
<b>D0033</b>	Uhtjärve: Nõiamaja	57,89013	26,58569
<b>D0074</b>	Herne 38-4 Tartu	58,3859069	26,7120984
<b>D0075</b>	Ihaste tee 10, Tartu	58,359904	26,760348
<b>D0076</b>	Kastani 32-3, Tartu	58,3721287	26,7118152
<b>D0077</b>	Kesk 26-5, 50114 Tartu	58,3681618	26,7235356
<b>D0078</b>	Kõrtsi-Tõramaa, Põhja-sakala, Sandra, Viljandimaa, Tipu küla 71201	58,4308848	25,0290972
<b>D0079</b>	Matka tee 24, Tallinn	59,4809409	24,856765
<b>D0080</b>	Männiku tee 103-8 Tallinn	59,3741787	24,7161911
<b>D0081</b>	Roosi 40A-1 Tartu	58,3887071	26,7345377
<b>D0082</b>	Turu 7, Tartu	58,3760221	26,7293619
<b>D0083</b>	Valge 8-5 Tallinn	59,4374078	24,7992441
<b>D0084</b>	Väike kaar 16, Tartu	58,3634974	26,7128963
<b>D0085</b>	Väike-Antoni, Lehtmetsa, 73410, Järva vald, Järvamaa	59,20950	25,57138
<b>D0086</b>	Õpiku talu, Meeri Küla Nõovald Tartumaa	58,2867	26,4467
<b>D0488</b>	Ülemiste hotel	59,4196344	24,7917867
<b>D0563</b>	Ravila 14a, Tartu	58,36727058478776	26,693128534619188
<b>D0564</b>	Lai 40, Tartu	58,38464149148442	26,72257421133185
<b>D0565</b>	Liivi 2, Tartu	-	-

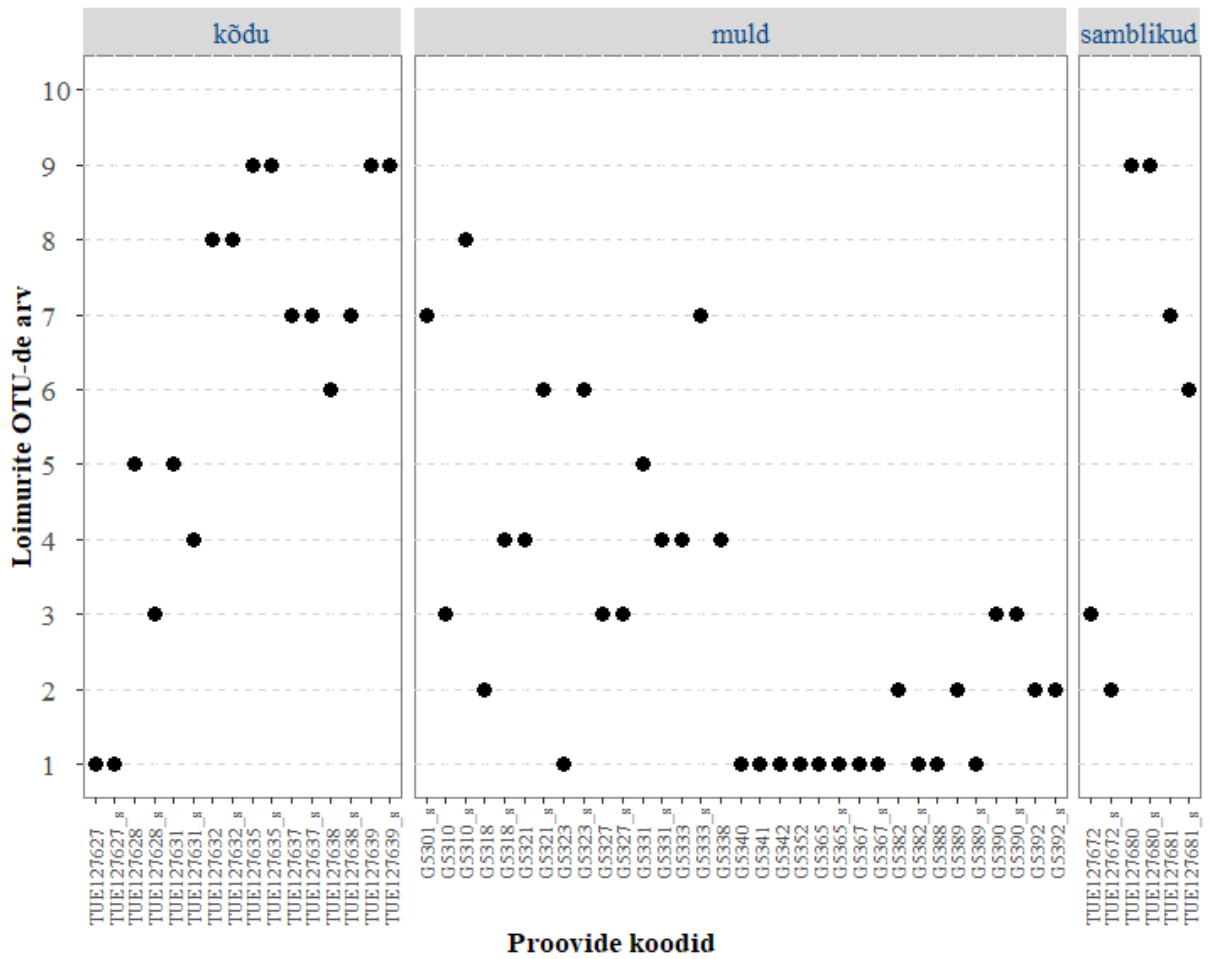
**Lisa 5.** Kasutatud praimerite järjestused ja nimetused koos 8 bp märgistega. Rasvases kirjas on praimerid ja harilikus kirjas on indeks, mis võimaldab eristada järjestused üksteisest bioformaatilisel analüüsil.

<b>COI regiooni amplifitseerimiseks kasutatud praimerid</b>	
<b>Pärisuunalised praimerid</b>	
<b>Nimetus</b>	<b>Praimerid järjestus</b>
BF2_TardF_F1	AACAAGCCGCNCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardF_F2	AGGAATGAGGCNCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardF_F3	GTAATTGCCGGCNCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardF_F4	ATACGACCATAGCNCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardF_F5	GTCTATGCTGACGCNCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardF_F6	TGAGACAGGCNCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardF_F7	TGAGCTTACGCNCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardF_F8	GATTACCAGGGCNCCNGAYATRCNTTYCC
<b>Modifitseeritud pärisuunalised praimerid</b>	
BF2_TardFs_F9	TGAGAGCTCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardFs_F10	ACTGACCTTCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardFs_F11	TCATGCTTGGCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardFs_F12	TGTAACACCGTCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardFs_F13	GTAATTACCGCTCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardFs_F14	TCCAGTATGCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardFs_F15	TGAGATGCCNGAYATRCNTTYCC
BF2_TardFs_F16	ATGTGCAACTCCNGAYATRCNTTYCC
<b>Vastassuunalised praimerid</b>	
TardR_R1	GGTACTGGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R2	TAGATGGAGGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R3	CACGTGATACGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R4	GTAATCTTCCGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R5	TCCTATTCTCGCGWARAATHARAATATADAC

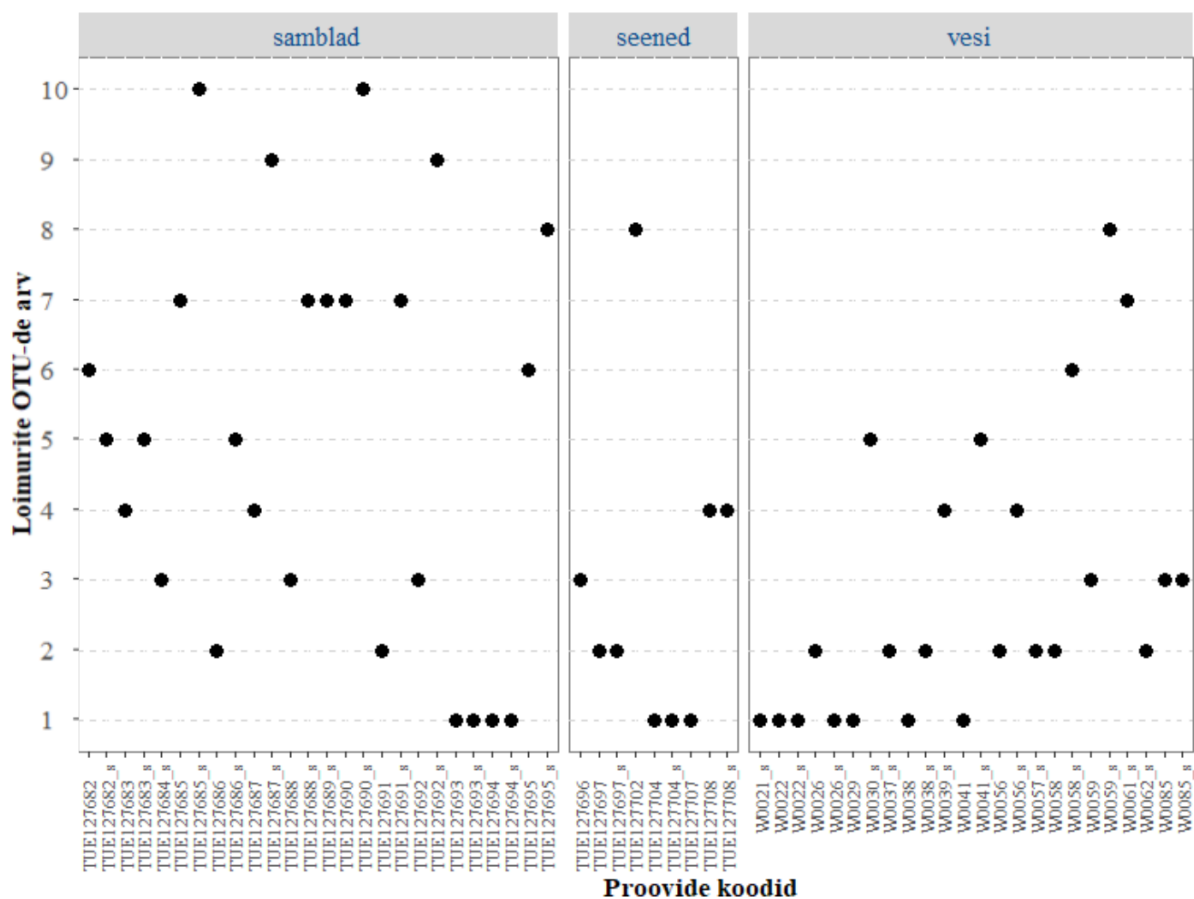


TardR_R6	TCGATTGCGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R7	ACATGGCAAGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R8	CATCCGAAGAGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R9	CGTTCTACACCGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R10	GCTACTTGACGAGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R11	TCGCATACGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R12	TCATGTACGGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R13	GATGAGTGACGGWARAATHARAATATADAC
TardR_R14	CATGGTTCGAAGGWARAATHARAATATADAC
<b>18S rRNA regiooni amplifitseerimiseks kasutatud praimerid</b>	
<b>Pärisuunalised praimerid</b>	
18S.TarF_F1	AACAAGCCCCAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarF_F2	AGGAATGAGCCAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarF_F3	GTAATTGCCGCCAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarF_F4	ATACGACCATAACCAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarF_F5	GTCTATGCTGACCCAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarF_F6	TGAGACAGCCAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarF_F7	TGAGCTTACCCAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarF_F8	GATTACCAGGCCAGCASCYGCGGTAATTCC
<b>Modifitseeritud pärisuunalised praimerid</b>	
18S.TarFs_F9	TGAGAGCTAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarFs_F10	ACTGACCTTAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarFs_F11	TCATGCTTGGAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarFs_F12	TGTAACACCGTAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarFs_F13	GTAATTACCGCTAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarFs_F14	TCCAGTATGAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarFs_F15	TGAGATGCAGCASCYGCGGTAATTCC
18S.TarFs_F16	ATGTGCAACTAGCASCYGCGGTAATTCC

<b>Vastassuunalised praimerid</b>	
18S.TarR_R1	<b>GGTTACTGACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R2	<b>TAGATGGAGACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R3	<b>CACGTGATACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R4	<b>GTTACTTCTCCACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R5	<b>TCCTATTCTCGCACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R6	<b>TCGATTGCACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R7	<b>ACATGGCAAACCTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R8	<b>CATCCGAAGAACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R9	<b>CGTTCTACACCACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R10	<b>GCTACTTGACGAACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R11	<b>TCGCATACACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R12	<b>TCATGTACGACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R13	<b>GATGAGTGACACTTTCGTTCTTGATYRA</b>
18S.TarR_R14	<b>CATGGTTCGAACTTTCGTTCTTGATYRA</b>



**Lisa 6.** OTU-de arv proovides, kus substraatideks olid kõdu, muld, samblikud. Mustad täpid joonisel peegeldavad tuvastatud loimuri OTU-de arvu proovides. Täht “s” proovi koodi lõpus tähendab, et DNA amplifitseerimiseks kasutati modifitseeritud praimerit. Kui proovi koodil puudub paar “s” tähega või vastupidi, tähendab, proovi tuvastatud OTU-de arv oli 0.



**Lisa 7.** OTU-de arv proovides, kus substraatideks olid samblad, seemed, vesi. Mustad täpid joonisel peegeldavad tuvastatud loimuri OTU-de arvu proovides. Täht “s” proovi koodi lõpus tähendab, et DNA amplifitseerimiseks kasutati modifitseeritud praimerit. Kui proovi koodil puudub paar “s” tähega või vastupidi, tähendab, proovi tuvastatud OTU-de arv oli 0.

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

Mina, Natalia Sirenko,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose **“Loimurite tuvastamine keskkonnaproovide DNA-st”**, mille juhendaja on PhD Sten Anslan, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Natalia Sirenko*

**19.05.2023.**