

**Rohevetika *Limnomonas gaiensis* iseloomustamine kolme  
molekulaarse markeri põhjal**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Marlene Kaljumäe

Juhendajad: Sirje Sildever, TalTech Meresüsteemide Instituut, teadur  
Maria Cecilia Sarmiento Guerin, TalTech Keemia ja Biotehnoloogia Instituut, vanemteadur

Lenne Nigul, TalTech Keemia ja Biotehnoloogia Instituut, insener  
Sylvie V.M. Tesson, Aarhushi ülikool Bioloogia Instituut, nooremprofessor

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia

## **Autorideklaratsioon**

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Marlene Kaljumäe  
[allkirjastatud digitaalselt]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Sirje Sildever  
[allkirjastatud digitaalselt]

Töö on lubatud kaitsmisele.  
Kaitsmiskomisjoni esimees:



# **Characterization of the green alga *Limnomonas gaiensis* based on three molecular markers**

Bachelor thesis

Student: Marlene Kaljumäe

Supervisors: Sirje Sildever, Department of Marine Systems, researcher

Maria Cecilia Sarmiento Guerin, Department of Chemistry and Biotechnology, senior researcher

Lenne Nigul, Department of Chemistry and Biotechnology, engineer

Sylvie V.M. Tesson, Aarhus University, Department of Biology, assistant professor

Curriculum: Applied chemistry, food- and gene technology

# Sisukord

Autorideklaratsioon .....	2
LÜHENDITE JA MÕISTETE LOETELU .....	6
SISSEJUHATUS .....	7
1 Kirjanduse ülevaade .....	8
1.1 Fütoplankton .....	8
1.1.1 Rohevetikad .....	8
1.1.2 <i>Limnomonas gaiensis</i> .....	9
1.2 Molekulaarsed markerid .....	9
2 Töö eesmärk.....	11
3 Materjalid ja meetodid.....	12
3.1 Proovide päritolu.....	12
3.2 Molekulaarne töö.....	14
3.2.1 DNA eraldamine .....	14
3.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon.....	14
3.2.3 Geelelektroforees.....	14
3.2.4 DNA puhastamine PCR-i segust ja klonimine.....	15
3.2.5 Kompetentsete rakkude valmistamine ja transformatsioon.....	15
3.2.6 Koloonia PCR .....	15
3.2.7 DNA järjestuste kontroll, joondamine ja fülogeneetiline analüüs .....	16
4 Tulemused.....	17
4.1 23S rDNA järjestuste fülogeneetiline analüüs.....	17
4.2 Tsütokroom oksüdaas I (COI) järjestuste fülogeneetiline analüüs.....	18
4.3 Sisemise transkribeeritava sisetüki (ITS) järjestuste fülogeneetiline analüüs.....	19
5 Arutelu .....	20

6 Kokkuvõte .....	22
<i>Abstract</i> .....	23
Tänuavaldused .....	24
Kasutatud kirjandus .....	25
Lisad .....	29
Lisa 1. Uuritud tüved ja nende iseloomustamiseks kasutatud molekulaarsed markerid .....	29
Lisa 2. Töös kasutatud praimerid .....	31
Lisa 3. Ülevaade saadud DNA järjestuste vastetest NCBI andmebaasis.....	32

## LÜHENDITE JA MÕISTETE LOETELU

A – absorptsioon

AFLP – amplifitseeritud fragmendi pikkuse polümorfism (*amplified fragment length polymorphism*)

ap – aluspaar

COI – tsütokroom oksüdaas I (*cytochrome oxidase I*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

FNU – formasiini nefelomeetriline ühik (hägususe ühik)

ITS – sisemine transkribeeritav vahetükk (*internal transcribed spacer*)

LB – Luria-Bertani sööde

LSU – suur subühik (*large subunit*)

NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> – ammonium atsetaat

rDNA – ribosomaalne DNA

SNP – ühe nukleotiidi polümorfism (*single-nucleotide polymorphism*)

SSU – väike subühik (*small subunit*)

TAE – tris-atsetaat-etüleendiamiintetraädikhape

TSS – transformatsiooni ja hoiustamise lahus (*transformation and storage solution*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative polymerase chain reaction*)

## SISSEJUHATUS

Fütoplankton koosneb mikroskoopilistest organismidest, mis võivad eksisteerida ühe rakuna või moodustada rakkudest ahelaid või kolooniaid. Fütoplanktoni hulka kuuluvad organismid on veekeskkonnas olulised kui toiduahela esmased lülid ning globaalsel tasemel vastutavad nad poole kogu Maa primaarproduktiooni eest. Fütoplanktoni hulka kuuluvad organismid on pärit erinevatest taksonoomilistest rühmadest, millest liigrikkamad on näiteks dinoflagellaadid, ränivetikad, rohevetikad, kes esindavad eukarüoote, aga samuti ka prokarüootide hulka kuuluvad tsüanobakterid.

Antud töös keskendutakse magevees elavatele üherakulistele rohevetikatele. Rohevetikad on üks peamisi fotosünteesiliste eukarüootide rühmi. Neil on palju ühist maismaataimedega, näiteks kloroplastid, mis on ümbritsetud topelmembraaniga. Üks rohevetikate hõimkondadest on *Chlorophyta* (ehk klorofüüdid), mille alla kuulub käesolevas töös käsitletud perekond *Chlamydomonas*. See perekond on üks suurimaid rohevetikate seas, kuhu kuulub üle 600 liigi. Osa *Chlamydomonas*-e perekonda kuuluvaid liike on kirjeldatud morfoloogiliste tunnuste põhjal, samas kui osa potentsiaalseid liike on iseloomustatud ainult geneetiliste erinevuste põhjal, kuna morfoloogilised erinevused vetikarakkude vahel puuduvad. Morfoloogiliste erinevuste puudumise tõttu määratakse rutiinses fütoplanktoni seires valgusmikroskoobi abil *Chlamydomonas*-e perekonda kuuluvaid vetikarakke ainult perekonna tasemeni.

Käesolevas töös uuriti 2022. aastal Tesson-i ja Pröschold-i kirjeldatud rohevetikat *Limnomonas gaiensis*, mille rakud olid varasemalt tuvastatud kui *Chlamydomonas*-e perekonda kuuluvad. Uue liigi eripäraks on tema üsna väike suurus (keskmine pikkus 6.8  $\mu\text{m}$  ja laius 2.7  $\mu\text{m}$ ), omapärane kogu keha pendelliikumine ning koosinemine potentsiaalselt kahjuliku *Microcystis*-e perekonda kuuluva tsüanobakteri liigiga. Bakalaureusetöös kasutatud vetikatüved pärinevad eutroofsetest Rootsi järvedest, kus varasemalt on tuvastatud *Chlamydomonas*-e perekonda kuuluvaid rakke, mida ei ole võimalik liigini määrata.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli geneetiliselt iseloomustada hiljuti kirjeldatud rohevetika liiki *L. gaiensis*-t. Selleks analüüsiti neljast geograafilisest piirkonnast pärit vetikatüvede DNA järjestusi kolme molekulaarse markeri: 23S rDNA, sisemise transkribeeritava vahetüki (ITS) ja tsütokroom oksüdaas I (*COI*) põhjal. Töö hüpoteesiks oli, et erinevatest geograafilistest piirkondadest pärit vetikatüved näitavad uuritud markerites geneetilist erinevust. Saadud tulemused täiendavad uuritud liigi geneetilist iseloomustust ja annavad ülevaate, kuidas geeneetiliselt erinevad on neljast geograafilisest asukohast pärit vetikatüved antud markerite põhjal.

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Fütoplankton

Fütoplankton koosneb veekeskkonnas vabalt hõljuvatest fotosünteetilistest mikroorganismidest, kelle rakkude läbimõõt jääb vahemikku 0,2 µm kuni 2 mm (Reynolds, 2006). Fütoplanktoni hulka kuuluvad mikrovetikad on veeökosüsteemides olulised kui esmased tootjad ja anorgaaniliste toitainete ringlusesse võtjad. Fütoplankton toodab rohkem kui 45% kogu maakera esmasest produktsioonist, kuigi nad moodustavad umbes 1% Maa fotosünteetilisest biomassist. (Field *et al.*, 1998) Kõrge primaarproduktsiooni määr on tingitud nende kiirest kasvutempost, näiteks *Chlamydomonas*-e perekonda kuuluvate liikide puhul toimub rakkude arvukuse kahekordistumine 24 tunni jooksul (Cross ja Umen, 2015). Lisaks on erinevalt maismaa taimedest kõik vetikarakud fotosünteetiliselt aktiivsed, kuigi selles võib esineda erandeid nagu näiteks tsüanobakterite lämmastikku fikseerivad heterotsüstid ja vetikarakkude puhkestaadiumid (Pierella Karlusich *et al.*, 2020).

Kuna fotosüntees vajab valgust, siis on fütoplankton peamiselt aktiivne veekogude eufotilises ehk valgusküllases kihis. Selle kihi sügavus võib olenevalt veekogudest ja aastaajast erineda, sõltudes valgust hajutavate ja neelavate ainete, näiteks setteosakeste ja orgaanilise aine kontsentratsioonist, aga ka fütoplanktoni hulka kuuluvate liikide rakkude arvukusest, mille massvohamised vähendavad veekogu pinnakihist sügavamale jõudvat valgust. (Käse ja Geuer, 2018)

Fütoplanktoni seas leidub nii prokarüoote kui ka eukarüoote. Eukarüootide hulka kuuluvad näiteks dinoflagellaadid ja ränivetikad, aga ka kokolitofoorid, pelagofüüdid ja prasinofüüdid (Pierella Karlusich *et al.*, 2020). Prokarüootidest kuuluvad fütoplanktoni hulka tsüanobakterid, mis sarnaselt eukarüootsele fütoplanktonile võivad esineda nii üksikute rakkude, filamentide või kolooniatena (Laugaste *et al.*, 2013).

### 1.1.1 Rohevetikad

Rohevetikad on mitmekesised ning laialt levinud vee- ja mõnedes maismaakeskkondades ning nad on mänginud olulist rolli globaalses ökosüsteemis juba sadu miljoneid aastaid (Leliaert *et al.*, 2012). Maismaataimede arenemine rohevetikatega ühisest esivanemast oli maismaa ökosüsteemide arengu seisukohast võtmesündmus, mis on toonud kaasa märkimisväärseid muutusi maakera keskkonnas, näiteks suurendanud biosfäärile kättesaadavat energiat, muutunud aineringeid ning atmosfääri koostist (Bowles *et al.*, 2022). Fotosünteesivad eukarüoodid arenesid arvatavasti kui heterotroofne eukarüootne peremeesrakk püüdis kinni prokarüootse tsüanobakteri, mis integreerus eukarüootsesse raku ning arenes lõpuks plastiidiks. See esmane endosümbioos toimus tõenäoliselt 1-1,5 miljardit aastat tagasi ning tähistas kõige varasemate fotosünteetiliste eukarüootide teket. (Leliaert *et al.*, 2012)

Rohevetikate üks hõimkondadest on *Chlorophyta*, mille alla kuulub suurem osa kirjeldatud rohevetikaliike (7698 liiki 12987-st *AlgaeBase* andmebaasi põhjal, Guiry, 2023). *Chlorophyta* hõimkonda kuuluvaid liike leidub mage- ja merevees ning isegi maismaal. Käesolevas töös keskenduti liigile, mis



kuulub perekonda *Chlamydomonas* Ehrenberg (selts *Chlamydomonadales*). (Leliaert *et al.*, 2012) Selle perekonna liigid on levinud kogu maailmas, neid leidub parasvöötmes, troopikas ning ka polaaraladel. Praeguseks kirjeldatud liike on isoleeritud mageveejärvedest ja -tiikidest, mere- ja riimveest, kanalisatsioonitiikidest, lumest, aia- ja põllumullast, metsadest, kõrbetest ning turbarabadest. (Harris, 2009)

Traditsiooniliselt hõlmab perekond *Chlamydomonas* kõiki kahe viburiga rohevetikaid, kelle viburid on ühepikkused ja asuvad üksteise vahetus läheduses ning rakud sisaldavad ühte kloroplasti koos pürenoidi(de)ga. Kuna neid tunnuseid leidub ka teistes perekondades, siis ei ole võimalik ainult nende põhjal perekonda kuuluvaid liike määratleda. Seepärast peetakse perekonda *Chlamydomonas* kunstlikuks taksoniks, mis hõlmab kõiki viburitega üherakulisi rohevetikaid, millel esinevad ülalmainitud tunnused, aga puuduvad muud iseloomulikud jooned. Liikide piiritlemine selles perekonnas on keeruline, kuna paljud algsete liikide iseloomustused põhinevad valgusmikroskoobiga tehtud üksikutel vaatlustel, arvestamata raku morfoloogiliste tunnuste varieeruvusega populatsioonis või elutsükli. Lisaks puudub paljude *Chlamydomonas*-e perekonda kuuluvate liikide kohta geneetiline iseloomustus. (Pröschold *et al.*, 2001) Märkimisväärseks erandiks on *Chlamydomonas reinhardtii*, mille terve genoom suurusega 120 mega aluspaari on sekveneeritud. *Chlamydomonas reinhardtii* on mudelorganism uurimaks eukarüootset fotosünteesi, eukarüootsete viburite struktuuri ja funktsiooni ning erinevate geenide funktsioone. (Merchant *et al.*, 2007; Fauser *et al.*, 2022 )

### **1.1.2 *Limnomonas gaiensis***

Üheks näiteks, et *Chlamydomonas*-e perekond võib sisaldada uusi liike, on käesolevas töös uuritud *L. gaiensis*, mille Tesson ja Pröschold 2022. aastal kirjeldasid. Kirjeldamiseks kasutatud tüved pärinesid eutroofsetest Rootsi järvedest, millest oli eelnevalt tuvastatud *Chlamydomonas*-e perekonda kuuluvaid vetikarakke, mida polnud varasemalt liigini tuvastatud. Väliste tunnuste põhjal eristab *L. gaiensis*-st teistest *Chlamydomonas*-e perekonda kuuluvatest liikidest lapik ja sfääriline rakukuju, raku ülemises otsas asuv rakust eemale ulatuv osa, millele kinnituvad kaks ühepikkust viburit ja raku küljel asub valgustundlik täpp. Rakkude keskmine pikkus on 6.8 µm ja laius 2.7 µm. Lisaks iseloomustab antud liiki ka rakkude pendelliikumine. Seda, et *L. gaiensis*-e puhul on tegemist uue liigiga, näitas ka 18S ribosomaalse DNA (rDNA) põhjal läbi viidud fülogeneetiline analüüs, kuna uuritud tüved paigutusid paljudest teistest varasemalt kirjeldatud liikidest eraldi paiknevasse klaadi. *Limnomonas gaiensis*-st leidub Rootsi ja Inglismaa eutroofsetes järvedes. Liik esineb vabalt elavate rakkudena, kuid mõnikord moodustavad rakud ka rühmi ning suudavad kasvada koos potentsiaalselt kahjuliku *Microcystis*-e perekonda kuuluva tsüanobakteri liigiga. (Tesson ja Pröschold, 2022)

## **1.2 Molekulaarsed markerid**

Rohevetikate identifitseerimine võib osutada keeruliseks, kuna paljudel liikidel puuduvad konkreetselt eristuvad tunnused ning lisaks võivad samasse liiki kuuluvad rakud olla väliselt väga erinevad. Tihti kasutatakse eristuvate tunnuste uurimiseks valgus-, fluorestsents- või elektronmikroskoopi, mille abil vaadatakse nende rakkude üldist kuju, kloroplastide ja pürenoidide kuju ning asukohta ja

arenguetappe. (Hall *et al.*, 2010) Rutiinse fütoplanktoni seire käigus kasutatava valgusmikroskoobiga võib mõnede rakkude liigini tuvastamine olla võimatu, kuna rakud on liiga väiksed ( $< 20 \mu\text{m}$ ), puuduvad eristuvad tunnused või on nende liigisisene varieeruvus liialt suur (John *et al.*, 2005; Galluzzi *et al.*, 2008). Välimuse põhjal raskesti tuvastatavate liikide paremaks identifitseerimiseks keskkonnast pärit proovidest võib kasutada molekulaarseid meetodeid, näiteks polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) liigispetsiifiliste markeritega, metatriipkoodimist või kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) (Hall *et al.*, 2010). Tavaliselt kasutatakse selleks spetsiifilise geeni varieeruvat osa, mille põhjal on võimalik tuvastada erinevaid liike (Fawley ja Fawley, 2020).

Vetikate tuvastamiseks on välja pakutud mitmeid geene ja geenipiirkondi. Näiteks, mitokondriaalse DNA geeni tsütokroom oksüdaasi I (*COI*) 5' otsa kasutatakse laialdaselt looma- ning mõningate vetikarühmade (pruun- ja punavetikate) liigiliseks tuvastamiseks. (Hall *et al.*, 2010) *COI* markerit on kasutatud ka erinevatest geograafilistes piirkondadest pärit fütoplanktoni liikide fülogeneetiliseks analüüsiks (Lebret *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2021; Zou *et al.*, 2021). Teiseks tavapäraselt fütoplanktoni fülogeneetilistes uuringutes kasutavaks markeriks on sisemine transkribeeriv vahetükk (ITS; Stern *et al.*, 2012; Allewaert *et al.*, 2015; Lebret *et al.*, 2015; Darienko *et al.*, 2021), mis asub suure ja väikse ribosomaalse subühiku geenide vahel ning sisaldab ka 5.8S ribosomaalse DNA (rDNA) geeni. Sõltudes taksonist võib ITS pikkus olla mõnisada või rohkem kui tuhat aluspaari (ap) pikk. (Hall *et al.*, 2010) Ka ribosomaalse DNA geene kasutatakse tuvastamiseks potentsiaalseid erinevusi erinevatest geograafilistest piirkondadest pärit vetikatüvede DNA järjestustes. Kõige sagedamini kasutatakse selleks väikese subühiku (SSU) geeni (16S – prokarüootidel rakutuumas/eukarüootidel kloroplastis ja 18S – eukarüootidel rakutuumas). (Tartar *et al.*, 2003; Flechtner *et al.*, 2013; Johansen *et al.*, 2014) Ka suure subühiku (LSU) geeni (prokarüootidel rakutuumas/eukarüootidel kloroplastis: 23S ja rakutuumas: 28S) saab kasutada mikroorganismide liikidevaheliste ja liigisiseste geneetiliste erinevuste tuvastamiseks (Watanabe *et al.*, 2006; Steven *et al.*, 2012; Ewing *et al.*, 2014; Possmayer *et al.*, 2016; Ferro *et al.*, 2018). 23S rDNA geeni pikkus on keskmiselt 2900 ap, mis on umbes kaks korda pikem kui 16S rDNA geen, mistõttu on see informatiivsem marker (Yilmaz *et al.*, 2011).

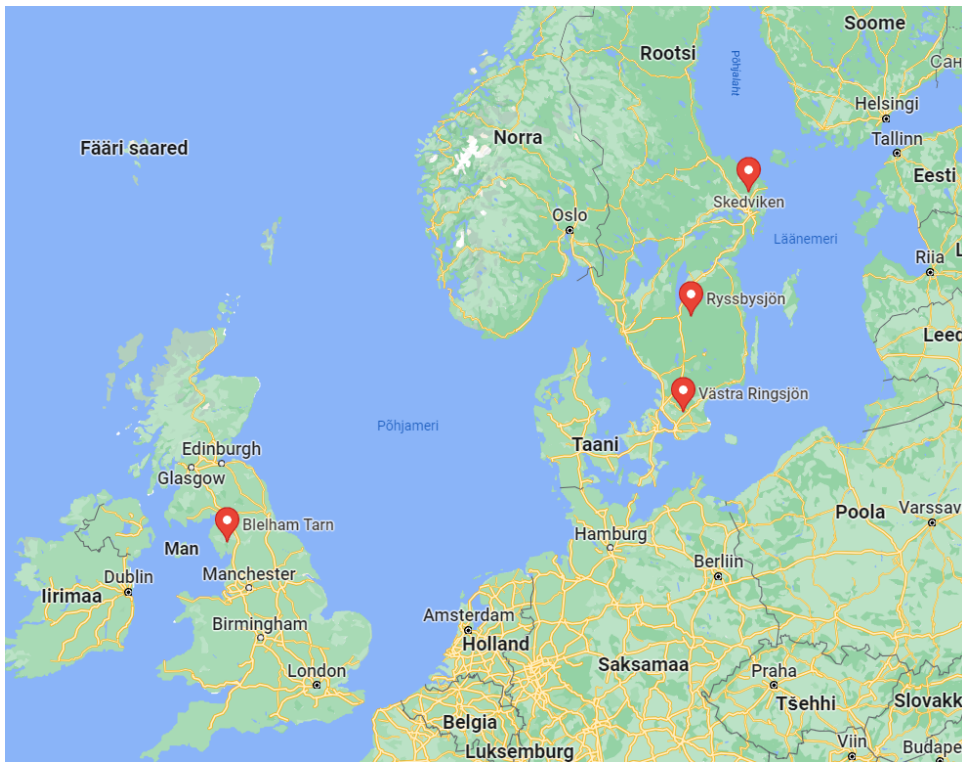
## 2 Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli iseloomustada rohevetika *L. gaiensis* DNA järjestusi kolme molekulaarse markeri: 23S, ITS ja *COI* põhjal ning tuvastada järjestuste fülogeneetilise analüüsi põhjal geneetilisi erinevusi uuritavate tüvede vahel. Töö hüpoteesiks oli, et neljast erinevast geograafilisest asukohast pärit sama liigi esindajad näitavad uuritud markerite põhjal geneetilisi erinevusi.

## 3 Materjalid ja meetodid

### 3.1 Proovide päritolu

Lõputöös kasutatud rohevetika tüved pärinevad kolmest eutroofsest Rootsi järvest: Ryssbysjön (18 tüve), Skedviken (7 tüve) ja Västra Ringsjön (5 tüve) ning ühest eutroofsest järvest Suurbritannias (Blelham Tarn, Inglismaa) (Joonis 1). Suurbritanniast pärit tüvi telliti vetikate ja algloomade kultuurikollektsioonist (*Culture Collection of Algae and Protozoa*, tüvi CCAP 11/119). Rootsi järvedest pärit vetikatüvede puhul proovivõtt, rakkude isoleerimine ja kasvatamine viidi läbi Sylvie V.M. Tesson-i poolt (Aarhusi ülikool, Taani) ja selle täpne kirjeldus on välja toodud Tesson-i ja Pröschold-i 2022. aastal avaldatud artiklis. Kokku kasutati käesolevas töös 31 *L. gaiensis*-e tüve (Lisa 1).



Joonis 1. Proovivõtukohtade kaart, muudetud Google Maps (2023) põhjal

**Tabel 1.** Ülevaade Rootsi ja Suurbritannia järvedest, kust pärinevad töös kasutatud vetikatüved.

Parameetrid	Skedviken	Ryssbysjön	Västra Ringsjön	Blelham Tarn
Koordinaadid	59°47.30' N; 18°17.44' E	57°54.78' N; 14°37.68' E	55°54.78' N; 13°27.17' E	54°23'44"N; 2°58'41"W
Temperatuur (°C)*	5.8 – 24.3 (20)	1.5 – 23.4 (23)	1.3 – 23.6 (25)	3.2 – 19.4
Hägusus (FNU)	6 - 30	4 – 86	3 – 26	–
pH	7.9 – 9.1	6.8 – 9.1	7.6 – 9.1	6.74 – 8.02
Aluselisis (mekv/l)	1.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.9 ± 0.2	–
Juhtivus (mS/m)	23.1 ± 1.5	15.4 ± 2.4	26.9 ± 2.2	9.1 ± 1.3
Soolsus (psu)	<0.5, magevesi	<0.5, magevesi	<0.5, magevesi	<0.5, magevesi
üldlämmastik (µg/l)	1206 ± 140	1376 ± 566	961.2 ± 256.3	653.15 ± 191.4
üldfosfor (µg/l)	80 ± 22	107 ± 58	98.3 ± 33.0	23.9 ± 9.42
SO <sub>4</sub> (mg/l)	5.9 ± 4.0	5.7 ± 2.2	6.9 ± 4.8	5.2 ± 0.1
Andmepunktide arv	2588	6171	1314	138
Andmete ajavahemik	2006 – 2020	2004 – 2020	1998 – 2021	2000 – 2022
Andmete periood	august – november	august – november	august – november	jaanuar – detsember

\* Veetemperatuur proovi võtmise ajal on näidatud sulgudes. Tabel on muudetud Tesson ja Pröschild (2022) artikli põhjal ning Rootsi järvede andmed pärinevad Rootsi Põllumajandusülikooli andmebaasist (<https://miljodata.slu.se/mvm/>). Blelham Tarni andmed on pärit Suurbritannia Ökoloogia ja Hüdroloogia Keskuse andmebaasist (UK Centre..., 2023). FNU - formasiini nefelomeetriline ühik (hägususe ühik)

## 3.2 Molekulaarne töö

### 3.2.1 DNA eraldamine

Rootsi järvedest pärit vetikatüvede DNA eraldati Sylvie V. M. Tesson-i poolt Aarhuse ülikoolis kasutades CTAB eraldamisprotokolli nagu Tesson-i ja Pröschold-i (2022) artiklis mainitud. Suurbritanniast pärit tüve puhul viidi DNA eraldus läbi Tallinna Tehnikaülikoolis, Keemia- ja biotehnoloogia instituudis kasutades sama meetodikat.

### 3.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon

Kontrollimaks püstitatud hüpoteesi uuriti kolme markeri: ITS, *COI* ja 23S DNA järjestusi kõikidest järvedest pärinevatel tüvedel. Kõikide uuritavate markerite paljundamiseks viidi läbi polümeraasi ahelreaktsioon (PCR). Ühe proovi jaoks kasutati 4 µl PCR-i kokteili komplekti HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis BioDyne), 0,5 µl praimereid (10 µM), 14 µl DNA/RNA vaba vett ning 1 µl DNA-d. Ühe PCR reaktsiooni kogumaht oli 20 µl.

23S rRNA geeni paljundamiseks kasutati praimereid p23SrV\_f1 ja p23SrV\_r1 (Sherwood ja Presting, 2007) (Lisa 2). 23S PCR programm algas ühekordse ensüümi aktivatsiooniga: 15 minutit 95°C juures ning sellele järgnes 35 tsüklit: denaturatsioon: 20 sekundit 95°C juures, praimerite hübridisatsioon: 30 sekundit 55°C juures ja elongatsioon: 30 sekundit 72°C juures. Seejärel pikendati amplifitseeritud DNA fragmente 72°C juures 10 minutit.

ITS puhul kasutati ITS-A ja ITS-B praimereid (Goff ja Moon, 1993) (Lisa 2). ITS PCR programmi esimeseks etapiks oli ühekordne ensüümi aktivatsioon: 15 minutit 95°C juures, millele järgnes 35 tsüklit: denaturatsioon: 30 sekundit 95°C juures, praimerite hübridisatsioon: 30 sekundit 60°C juures ja elongatsioon: 1 minut 72°C juures. Viimases etapis pikendati amplifitseeritud DNA fragmente 5 minutit 72°C juures.

*COI* PCR praimeriteks olid LCO1490 ja HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) (Lisa 2). *COI* PCR programm algas ühekordse ensüümi aktivatsiooniga: 15 minutit 95°C juures. Sellele järgnes 35 tsüklit: denaturatsioon: 1 minut 95°C juures, praimerite hübridisatsioon: 1 minut 50°C juures ja elongatsioon: 2 minutit 65°C juures. Viimasena pikendati amplifitseeritud DNA fragmente 65°C juures 10 minutit.

### 3.2.3 Geelelektroforees

Saadud PCR tulemuste kontrollimiseks tehti geelelektroforees, mille jaoks valmistati 150 ml 1% geeli, kasutades agarosi ja tris-atsetaat-etüleendiamiintetraädikhape (TAE) puhvrit ning värvaineks lisati etiidiumbromiidi (Naxo Smart Mix, Naxo OÜ, lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml). Geelile pipeteeriti 5 µl PCR-i reaktsiooni, millele oli lisatud 1 µl laadimispuhvrit (6x TriTrack DNA Loading Dye, Thermo Scientific). Geeli jooksutati 120 V 30 minutit. Järele jäänud PCR segud saadeti puhastamiseks ja sekveneerimiseks Tartu Ülikooli Genoomika tuumiklaborisse.

### 3.2.4 DNA puhastamine PCR-i segust ja kloneerimine

Kuna Tartu Ülikooli Genoomika tuumiklaborist saadud kahe paralleelse Suurbritanniast pärit vetikatüve ITS PCR proovi sekveneerimistulemused näitasid erinevusi, siis otsustati järjestuse täpsustamiseks kasutada kloneerimist. Selleks sadestati varasemalt ITS markerite abil paljundatud DNA, mille jaoks lisati 20 µl PCR-i segule 80 µl DNA/RNA-vaba vett, 10 µl NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> ja 200 µl etanooli ning segati keerissegajal. Segu hoiti -20°C juures 30 minutit. Seejärel tsentrifugeeriti sade tuubi põhja (14 minutit 13,2 x 1000 täispööratel) ning eemaldati vedelik ja lisati 300 µl 70% etanooli. Segu tsentrifugeeriti (4 minutit 13,2 x 1000 täispööratel), eemaldati vedelik ja lasti kuivada. Sadestatud DNA lahustati DNA/RNA vabas vees ning mõõdeti NanoDrop spektrofotomeetriga (ThermoFisher Scientific) DNA kontsentratsioon 260 nm juures. Kloneerimiseks kasutati Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit-i. Tõmbistamisreaktsioon tehti puhastatud DNA ja puhastamata PCR-i produktiga. Kahele mikrolitrile puhastatud DNA-le lisati 10 µl 2x reaktsioonipuhvrit, 5 µl DNA/RNA-vaba vett ja 1 µl DNA tõmbistamisensüümi. Ühele mikrolitrile puhastamata PCR produktile lisati 10 µl 2x reaktsioonipuhvrit, 6 µl DNA/RNA-vaba vett ja 1 µl DNA tõmbistamisensüümi. Segu segati õrnalt ja tsentrifugeeriti paar sekundit ning inkubeeriti 5 minutit 70°C juures ja jahutati jääl. Ligeerimiseks lisati eelnevalt valmistatud reaktsioonile 1 µl pJET1.2/blunt kloonimisvektorit ja 1 µl T4 DNA ligaasi. Reaktsioon segati õrnalt ja lasti 5 minutit seista toatemperatuuril. Reaktsioonisegu hoiustati -20°C juures.

### 3.2.5 Kompetentsete rakkude valmistamine ja transformatsioon

Kompetentsete rakkude valmistamiseks kasutati *Escherichia coli* DH5α kultuuri ja Luria-Bertani (LB) söödet. Ühe liitri LB söötme tegemiseks kasutati 10 g trüptooni, 5 g pärmiekstrakti ja 10 g NaCl. Üleöö kasvanud DH5α kultuurist inokuleeriti 500 µl 50 ml-sse LB söötmesse ja kasvatati absorptsioonini (A<sub>600</sub>) 0,5 loksutil 37°C juures. Seejärel segati rakkudega söödet jääl, et nende kasvamine peatada. Segu tsentrifugeeriti 5 minutit 5000 täispööratel. Rakkudelt eemaldati sööde dekanteerides. Resuspendeerimiseks lisati 50 ml jääkülma transformatsiooni ja hoiustamise lahust (*transformation and storage solution*, TSS), mille tegemiseks lisati 50 ml-le LB söötmele 500 µl 2M MgCl<sub>2</sub>, 5 g PEG-4000 ja 2,5 ml DMSO-t. Suspensioon jagati 100 µl kaupa 1,5 ml tuubidesse. Tuubid külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati -80°C juures.

Kompetentsete rakkude transformatsiooni efektiivsuse määramiseks lisati 100 µl rakkudele 1 µg plasmiidset DNA-d. Segu hoiti jääl 30 minutit ning siis tehti kuumašokk 1,5 minutit 42°C juures ja jahutati jääl. Segule lisati 900 µl LB söödet ning see pandi loksutile 30 minutiks 37°C juures. 10 µl segule lisati 990 µl LB söödet, millest külvati välja 10 µl ja 100 µl. Transformeeritud bakterid külvati LB tardsöötme tassidele, mis sisaldasid 100 µg/ml ampitsilliini. Tasse inkubeeriti üleöö 37°C juures. Tassidel kasvanud bakterikolooniad loendati. Ligatsiooni produktide transformeerimiseks kasutati kompetentseid rakke transformatsiooniefektiivsusega 10<sup>6</sup>.

### 3.2.6 Koloonia PCR

Inkubeeritud tassidelt korjati külvinõelaga laminaari all kümme kolooniat, millest igaüks lisati 20 µl-le PCR segule (3.2.1). PCR-i tingimused olid samad nagu varasemalt kirjeldatud (ITS). Koloonia PCR

tulemuste kontrollimiseks tehti geelelektrofoores 1% agarosgeelil. Järele jäänud PCR segud saadeti puhastamiseks ja sekveneerimiseks Tartu Ülikooli Genoomika tuumiklaborisse.

### 3.2.7 DNA järjestuste kontroll, joondamine ja fülogeneetiline analüüs

Kõikide sekveneeritud DNA järjestuste kvaliteeti kontrolliti visuaalselt kromatogrammide põhjal, kasutades MEGA 11.0 tarkvara (Tamura *et al.*, 2021). Lisaks võrreldi saadud DNA järjestusi NCBI GenBank andmebaasiga, et kontrollida, kas saadud DNA järjestused annavad lähima vaste andmebaasis olevate rohevetikaliikide, eriti *Chlamydomonas* spp. DNA järjestustega. Kõik töö käigus saadud järjestused on esitatud registreerimiseks rahvusvahelisse DNA järjestuste andmebaasi (*European Nucleotide Archive*). MEGA 11.0 tarkvara kasutati ka erinevatest järvedest pärit tüvede DNA järjestuste joondamiseks erinevate markerit põhjal (sh. kloneeritud ITS järjestuste joondamiseks ja võrdlemiseks teiste ITS järjestustega). Joondamiseks kasutati standardparameetritega ClustalW algoritmi. Joondatud järjestustes otsiti üles kasutatud praimerite järjestused ja uuriti nende vahele jäävaid DNA järjestusi võimalike erinevuste tuvastamiseks. Erinevatest järvedest pärit vetikatüvede geneetiliste erinevuste visualiseerimiseks kasutati fülogeneetilist analüüsi. Fülogeneetilises analüüsis kasutati iga järve kohta konsensus DNA järjestust, kuna samast järvest pärit tüved olid omavahel kõikide markerite puhul identsed. Selleks, et rõhutada erinevust Rootsi järvedest pärit vetikatüvede ja Inglismaalt pärit tüve vahel lisati iga DNA markeri järjestuste joondusesse ka *Chlamydomonas reinhardii* ja välisrühmana mõne teise rohevetikate hõimkonda kuuluva vetikaliigi vastava markeri DNA järjestused. Nende DNA järjestused saadi NCBI nukleotiidi andmebaasist ning nende registreerimisnumbrid on välja toodud joonistel 2-4. Fülogeneetiliste puude konstrueerimiseks kasutati MEGA 11.0 tarkvara ning maksimaalse sarnasuse meetodit ja Tamura-Nei mudelit (Tamura ja Nei, 1993). Fülogeneetiliste puude aluseks olevate DNA järjestuste puhul kasutati kõiki antud markeri joondatud järjestusi (sh. kohti, mis sisaldavad lisandunud või eemaldunud nukleotiidide). Puude topoloogiat hinnati 100 replikaadi abil. Puudel olevad numbrid näitavad protsentuaalselt, kui võrd eristunud on konkreetse puu konstrueerimiseks kasutatud DNA järjestused. Joonistel olev skaala näitab DNA järjestustes muutust ühe aluspaari kohta (joonised 2-4).

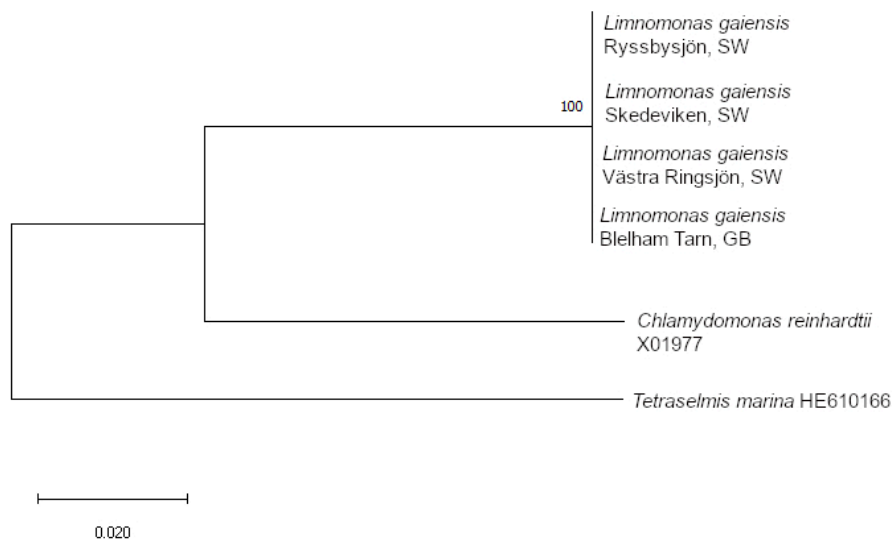


## 4 Tulemused

Kõik sekveneeritud järjestused andsid NCBI andmepangas kõige lähemaks vasteks rohevetikate hõimkonda kuuluva liigi või perekonnaga seotud DNA järjestuse (Lisa 3). Kõik 23S markeri põhjal saadud järjestused andsid parimaks vasteks *Chlamydomonas geitlerii* või *C. chlamydogama*. Seevastu ITS ja *COI* markerite puhul olid parimateks vasteteks teise rohevetikate perekonda kuuluv *Dunaliella salina* või rohevetika hõimkonda kuuluvad liigid, mille kohta täpsem taksonoomiline kirjeldus puudub.

### 4.1 23S rDNA järjestuste fülogeneetiline analüüs

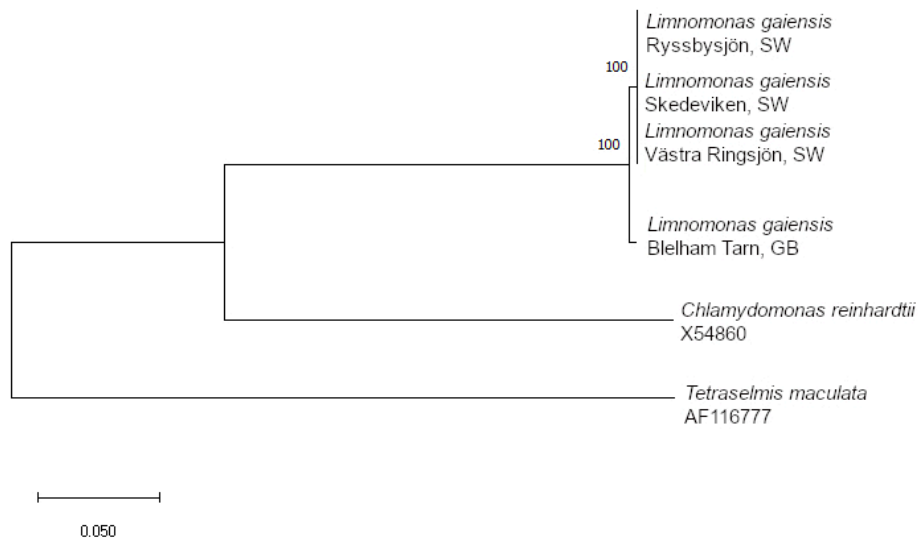
23S rDNA järjestused jäid vahemikku 396-402 ap ning potentsiaalsete erinevuste tuvastamiseks eri järvedest pärinevate tüvede vahel kasutatud 349 ap DNA järjestuste võrdlus ei näidanud erinevusi. Samuti ei olnud erinevusi Rootsi ja Inglismaa tüvede vahel.



**Joonis 2.** Fülogeneetiline analüüs 23S rDNA järjestuste maksimaalse sarnasuse põhjal (344 aluspaari). Rootsi järvede puhul on kasutatud iga järve kohta ühte DNA järjestust. Välisrühmana on kasutatud rohevetikate hõimkonda kuuluvat *Tetraselmis marina*-t. SW tähistab Rootsisist pärit tüvesid, GB Suurbritanniast pärit tüve.

## 4.2 Tsütokroom oksüdaas I (COI) järjestuste fülogeneetiline analüüs

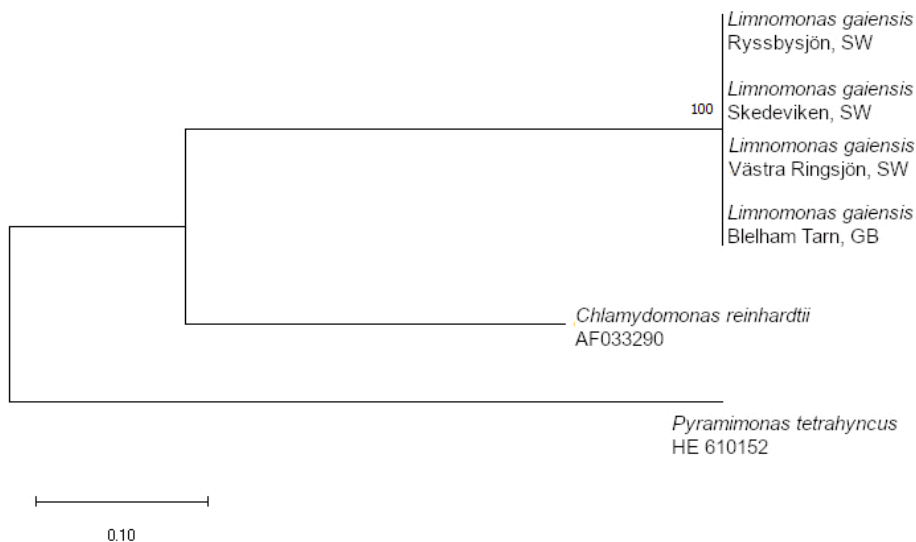
COI järjestused jäid vahemikku 678-689 ap ning potentsiaalsete erinevuste tuvastamiseks eri järvedest pärinevate tüvede vahel kasutatud 598 ap DNA järjestuste võrdlus ei näidanud erinevusi. Inglismaa tüves esines neljas positsioonis erinevus: joondatud tüvede 48. positsioonis oli T asendunud C, 165. positsioonis T asendunud A-ga, 297. positsioonis oli A asendunud T-ga ja 444. positsioonis oli T asendunud A-ga.



**Joonis 3.** Fülogeneetiline analüüs COI järjestuste maksimaalse sarnasuse põhjal (646 aluspaari). Rootsi järvede puhul on kasutatud iga järve kohta ühte DNA järjestust. Välisrühmana on kasutatud rohevetikate hõimkonda kuuluvat *Tetraselmis maculata*-t. SW tähistab Rootsist pärit tüvesid, GB Suurbritanniast pärit tüve.

### 4.3 Sisemise transkribeeritava sisetüki (ITS) järjestuste fülogeneetiline analüüs

Suurbritannia tüve CCAP 11/119 ITS järjestuste esialgse sekveneerimise tulemusel selgus, et üks DNA järjestus oli identne Rootsi järvedest pärit vetikatüvede järjestustega, samas kui teine samast tüvest sekveneeritud DNA järjestus erines rohkem kui kümnes positsioonis. Kuna mõlema järjestuse elektroferogrammid olid visuaalse hinnangu põhjal piisava kvaliteediga (nukleotiidide signaalid olid üksteisest selgesti eristatavad), siis kasutati peamise järjestuse tuvastamiseks kloneerimist. Kümnest sekveneeritud kloneeritud DNA järjestusest neli näitasid erinevusi peamiselt ühes positsioonis. Esimese klooni 525. positsioonis oli T asendunud C-ga, 2. klooni 274. positsioonis oli A asendunud G-ga ning 3. klooni 316. positsioonis oli A asendunud G-ga. Neljas kloon näitas erinevusi kahes positsioonis (143: T → C; 523: G → A). Samas olid kõik kloneerimisel saadud järjestused identsed või erinesid paaris positsioonis esimesel sekveneerimisel saadud järjestustega (sama tüvi) ning ühtlasi ka Rootsi järvedest pärit vetikatüvede DNA järjestustest. Kuna kloneeritud DNA järjestustes tuvastatud asendused olid leitavad korraga ainult ühes järjestuses, siis eeldati, et tegemist oli sekveneerimisvigadega ning neid ei võetud fülogeneetilises analüüsis arvesse. Fülogeneetiliseks analüüsiks kasutatud ITS järjestused jäid vahemikku 635-662 ap ning potentsiaalsete erinevuste tuvastamiseks eri järvedest pärinevate tüvede vahel kasutatud 518 ap DNA järjestuste võrdluses ei esinenud erinevusi.



**Joonis 4.** Fülogeneetiline analüüs ITS järjestuste maksimaalse sarnasuse põhjal (621 aluspaari). Rootsi järvede puhul on kasutatud iga järve kohta ühte DNA järjestust. Välisrühmana on kasutatud rohevetikate hõimkonda kuuluvat *Pyramimonas tetrahyncus*-t. SW tähistab Rootsist pärit tüvesid, GB Suurbritanniast pärit tüve.

## 5 Arutelu

Käesoleva töö tulemused pakuvad esialgse ülevaate 2022. aastal kirjeldatud rohevetikaliigi *L. gaiensis*-e geneetilisest mitmekesisusest kolme laialdaselt kasutatava molekulaarse markeri põhjal. Erinevatest järvedest ning riikidest pärit vetikatüved olid kahe markeri, 23S ja ITS põhjal identsed, mis on sarnane Tesson-i ja Pröscholdi (2022) saadud tulemustele. Nad näitasid fülogeneetilise analüüsi põhjal, et *L. gaiensis* on teistest *Chlamydomonas*-e perekonda kuuluvatest liikidest 18S rDNA geeni põhjal selgelt eristuv, kuid nii Inglismaalt kui kahest Rootsi järvest pärit tüved olid antud markeri põhjal geneetiliselt identsed. Käesolevas töös *COI* markeri põhjal tehtud fülogeneetiline analüüs näitas erinevusi Rootsist ja Inglismaalt pärit tüvede vahel. Saadud tulemused on olulised iseloomustamiseks selle hiljuti kirjeldatud liigi levikut Põhja-Euroopas ning alusinfoks edasistele uuringutele tema leviku kohta. Lisaks on töö käigus sekveneeritud DNA järjestused morfoloogia põhjal tuvastatud rakkudest oluliseks täienduseks rahvusvahelistes DNA järjestuste andmebaasides olevale geneetilisele informatsioonile, mis võimaldab liiki paremini tuvastada näiteks keskkonna DNA-põhistes uuringutes.

Saadud tulemus vastab üldjoontes ka Hall-i ja teiste (2010) poolt läbiviidud erinevate molekulaarsete markerite võrdluse tulemustele erinevate magevee rohevetikaliikide perekondade tuvastamiseks ja eristamiseks. Sarnaselt antud tööle näitas *COI* marker suurt liigisisest geneetilist varieeruvust, samal ajal kui 18S ja 23S markerid näitasid madalamat varieeruvust (Hall *et al.*, 2010). ITS marker näitas võrdluses kasutatud perekondade põhjal suurt liigisisest geneetilist varieeruvust (Hall *et al.*, 2010), samas käesolevas töös antud markeri põhjal geneetilisi erinevusi Rootsi ja Inglismaa järvedest pärit tüvede vahel ei tuvastanud. ITS markeri liigisisene varieeruvus oli madal ka Halli ja kaasautorite (2010) võrdluses kasutatud rohevetika perekonna (*Chlorosarcinopsis*) puhul, mis võib selgitada ka antud töö tulemusi ITS markeri puhul. Erinevate markerite informatiivsuse täpsemaks võrdlemiseks ja *L. gaiensis*-e edasisteks geneetiliseks iseloomustamiseks on järgnevates uuringutes oluline kaasata rohkem tüvesid erinevatest geograafilistest piirkondadest.

Lisaks tasub antud liigi erinevatest järvedest pärit populatsioonide uurimiseks kasutada ka populatsioonigeneetikas kasutatavaid markereid, näiteks mikrosatelliite või ühe nukleotiidi polümorfisme (SNP-d) (Rengefors *et al.*, 2017; 2021). See võimaldaks paremini hinnata populatsioonide geneetilist erinevust. Populatsioonigeneetika abil on Rootsi järvedes varasemalt uuritud magevees kahjulikke õitsenguid põhjustava mikrovetika *Gonyostmum semen*-i populatsioone, kuna antud liik on viimase viiekümne aasta jooksul oma levikut Põhja-Euroopas (k.a. Eestis) laiendanud (Rengefors *et al.*, 2021). Ka nendes uuringutes saadi tulenevalt markerist ja selle informatiivsusest erinevad tulemused. Näiteks, amplifitseeritud fragmendi pikkuse polümorfismi (AFLP) markerite põhjal ei leitud *G. semen*-i Rootsi, Norra ja Soome järvedest pärit populatsioonide vahel geneetilisi erinevusi, mis sobib kokku liigi hiljutise leviku laienemisega (Lebret *et al.*, 2013). Hilisem terve genoomi põhjal tehtud SNP-de uuring näitas *G. semen*-i populatsioonide geneetilist erinevust ida-lääne/kirde-kagu suunal, mida seostati vetikarakkude potentsiaalse transpordiga rändlindude poolt (Rengefors *et al.*, 2021). Laborikatsete põhjal on mõnede mikrovetikaliikide puhkestaadiumid võimelised üle elama transpordi lindude sülestikule kinnitatult või nende seedetraktis (Tesson *et al.*, 2018). Ka *L. gaiensis*-e leviku uurimiseks on

plaanis läbi viia laborikatsed, kus jäljendatakse lindudega seotud transporti iseloomustavaid tingimusi (temperatuur, pH, kuivamine).

## 6 Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli geneetiliselt iseloomustada 2022. aastal kirjeldatud rohevetikaliiki *Limnomonas gaiensis* ning võrrelda uuritavaid vetikatüvesid fülogeneetilise analüüsi abil. Selle jaoks kasutati kolmest Rootsi järvest ja ühest Suurbritannia järvest pärit vetikatüvesid, mida uuriti kolme molekulaarse markeri: 23S rDNA, *COI* ja ITS põhjal.

Erinevatest Rootsi järvedest ja Suurbritanniast pärit tüved olid identsed kahe markeri, 23S ja ITS põhjal, aga kolmas marker *COI* näitas erinevust Rootsi ja Suurbritannia tüvede vahel.

Töö hüpotees, et neljast erinevast geograafilisest asukohast pärit sama liigi esindajad näitavad uuritud markerite põhjal geneetilist erinevust, leidis kinnitust ainult *COI* markeri põhjal ning erinevus oli tuvastatav ainult Rootsi ja Suurbritannia päritolu vetikatüvede vahel, kuid mitte erinevatest järvedest pärit tüvede puhul.

*Limnomonas gaiensis*-e edasiseks geneetiliseks iseloomustamiseks peaks edasistes töodes kaasama rohkem tüvesid erinevatest geograafilistest piirkondadest, et saada rohkem informatsiooni potentsiaalsete geneetiliste erinevuste kohta.

## **Abstract**

The aim of this Bachelor's thesis was to genetically characterize the green algal species *Limnomonas gaiensis*. The hypothesis was that the algal strains from four different geographical locations display genetic differences based on the investigated markers.

The DNA sequences from 30 *L. gaiensis* strains from three Swedish lakes and one strain from Great Britain were analyzed based on three molecular markers: 23S rDNA, internal transcribed spacer (ITS), and cytochrome oxidase I (*COI*). The DNA sequences obtained based on the three markers were used for phylogenetic analysis. Strains from different lakes and countries were identical based on the 23S and ITS markers but the *COI* marker showed differences between the strains from Sweden and Great Britain.

The initial hypothesis was not confirmed based on 23S and ITS markers as there were no differences between the sequences obtained by the two markers. Although it was possible to detect differences between the Swedish and English strains based on the *COI* marker but among the strains from three Swedish lakes no genetic differentiation was detected.

Future studies aiming to characterize *L. gaiensis* should include more strains from different geographical locations to cover more of the potential genetic variability.

## **Tänuavaldused**

Käesoleva töö autor soovib tänada töö juhendajaid: Sirje Sildeveri suurepärase juhendamise ja toe eest töö valmimisel, Maria Cecilia Sarmiento Guerini teraste tähelepanekute eest, Lenne Nigulit juhendamise eest laboris ning Sylvie V.M. Tessori materjalide ja töö teema eest.

Suured tänusõnad ka Kristian Pördile, rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia teise kursuse tudengile, ning Keemia ja biotehnoloogia instituudi töötajatele, kes aitasid kaasa töö valmimisele.

Töö autor soovib ka tänada Mare Maalmaid keelekorrekture eest.



## Kasutatud kirjandus

- Allewaert, C. C., Vanormelingen, P., Pröschold, T., Gomez, P. I., Gonzalez, M. A., Bilcke, G., ... Vyverman, W. (2015). Species diversity in European *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *Phycologia*, 54(6), 583–598. <https://doi.org/10.2216/15-55.1>
- Bowles, A. M. C., Williamson, C. J., Williams, T. A., Lenton, T. M., Donoghue, P. C. J. (2022). The origin and early evolution of plants. *Trends in Plant Science*, xx(xx), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.09.009>
- Cross, F. R., Umen, J. G. (2015). The *Chlamydomonas* cell cycle. *Plant Journal*, 82(3), 370–392. <https://doi.org/10.1111/tpj.12795>
- Darienko, T., Rad-Menéndez, C., Campbell, C. N., Pröschold, T. (2021). Molecular phylogeny of unicellular marine coccoid green algae revealed new insights into the systematics of the Ulvophyceae (Chlorophyta). *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081586>
- Ewing, A., Brubaker, S., Somanchi, A., Yu, E., Rudenko, G., Reyes, N., ... Franklin, S. (2014). 16S and 23S plastid rDNA phylogenies of *Prototheca* species and their auxanographic phenotypes. *Journal of Phycology*, 50(4), 765–769. <https://doi.org/10.1111/jpy.12209>
- Fausser, F., Vilarrasa-Blasi, J., Onishi, M., Ramundo, S., Patena, W., Millican, M., ... Jinkerson, R. E. (2022). Systematic characterization of gene function in the photosynthetic alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Genetics*, 54(5), 705–714. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01052-9>
- Fawley, M. W., Fawley, K. P. (2020). Identification of eukaryotic microalgal strains. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 2699–2709. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02190-5>
- Ferro, L., Gentili, F. G., Funk, C. (2018). Isolation and characterization of microalgal strains for biomass production and wastewater reclamation in Northern Sweden. *Algal Research*, 32(August 2017), 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.006>
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., Falkowski, P. (1998). Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, 281, 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Flechtner, V. R., Pietrasiak, N., Lewis, L. A. (2013). Newly Revealed Diversity of Green Microalgae from Wilderness Areas of Joshua Tree National Park (JTNP). *Monographs of the Western North American Naturalist*, 6(1), 43–63. <https://doi.org/10.3398/042.006.0103>
- Galluzzi, L., Bertozzini, E., Penna, A., Perini, F., Pigalarga, A., Graneli, E., Magnani, M. (2008). Detection and quantification of *Prymnesium parvum* (Haptophyceae) by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 261–266. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02294.x>
- Guiry, M.D., Guiry, G.M. 2023. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org> [5. jaanuar 2023]
- Hall, J. D., Fučíkova, K., Lo, C., Lewis, L. A., Karol, K. G. (2010). An assessment of proposed DNA barcodes

- in freshwater green algae. *Cryptogamie Algologie*, 31(4), 529–555.
- Harris, E. H. (2009). The Genus *Chlamydomonas*. *The Chlamydomonas Sourcebook*, 2. trükk (Toim. Harris, E. H., Stern, D.B., Witman, G.B.), lk 1–24. Cambridge: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00001-0>
- Johansen, J. R., Bohunická, M., Lukešová, A., Hrčková, K., Vaccarino, M. A., Chesarino, N. M. (2014). Morphological and molecular characterization within 26 strains of the genus *Cylindrospermum* (Nostocaceae, Cyanobacteria), with descriptions of three new species. *Journal of Phycology*, 50(1), 187–202. <https://doi.org/10.1111/jpy.12150>
- John, U., Medlin, L. K., Groben, R. (2005). Development of specific rRNA probes to distinguish between geographic clades of the *Alexandrium tamarense* species complex. *Journal of Plankton Research*, 27(2), 199–204. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh160>
- Käse, L., Geuer, J. K. (2018). Phytoplankton Responses to Marine Climate Change – An Introduction. *YOUMARES 8 – Oceans Across Boundaries: Learning from each other* (lk 55–71). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-93284-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-93284-2_5)
- Laugaste, R., Panksep, K., Haldna, M. (2013). Dominant cyanobacterial genera in Lake Peipsi (Estonia/Russia): Effect of weather and nutrients in summer months. *Estonian Journal of Ecology*, 62(4), 229–243. <https://doi.org/10.3176/eco.2013.4.01>
- Lebret, K., Kritzberg, E. S., Rengefors, K. (2013). Population genetic structure of a microalgal species under expansion. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082510>
- Lebret, K., Tesson, S. V. M., Kritzberg, E. S., Tomas, C., Rengefors, K. (2015). Phylogeography of the freshwater raphidophyte *Gonyostomum semen* confirms a recent expansion in northern Europe by a single haplotype. *Journal of Phycology*, 51(4), 768–781. <https://doi.org/10.1111/jpy.12317>
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., ... Grossman, A. R. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, 318(5848), 245–250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Pierella Karlusich, J. J., Ibarbalz, F. M., Bowler, C. (2020). Phytoplankton in the Tara Ocean. *Annual Review of Marine Science*, 12, 233–265. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-010706>
- Possmayer, M., Gupta, R. K., Szyszka-Mroz, B., Maxwell, D. P., Lachance, M. A., Hüner, N. P. A., Smith, D. R. (2016). Resolving the phylogenetic relationship between *Chlamydomonas* sp. UWO 241 and *Chlamydomonas raudensis* sag 49.72 (Chlorophyceae) with nuclear and plastid DNA sequences. *Journal of Phycology*, 52(2), 305–310. <https://doi.org/10.1111/jpy.12383>
- Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U. G., Melkonian, M. (2001). Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov.

*Protist*, 152(4), 265–300. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00068>

Rengefors, K., Gollnisch, R., Sassenhagen, I., Härnström Aloisi, K., Svensson, M., Lebret, K., ... Ahrén, D. (2021). Genome-wide single nucleotide polymorphism markers reveal population structure and dispersal direction of an expanding nuisance algal bloom species. *Molecular Ecology*, 30(4), 912–925. <https://doi.org/10.1111/mec.15787>

Rengefors, K., Kremp, A., Reusch, T. B. H., Wood, A. M. (2017). Genetic diversity and evolution in eukaryotic phytoplankton: Revelations from population genetic studies. *Journal of Plankton Research*, 39(2), 165–179. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbw098>

Reynolds, C. S. (2006). Phytoplankton. *The Ecology of Phytoplankton*, (Toim. Usher, M., Saunders, D., Peet, R., Dobson, A.) Ii 1–37. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542145.002>

Song, H., Chen, Y., Gibson, K., Liu, S., Yu, Z., & Chen, N. (2021). High genetic diversity of the harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa* revealed using the molecular marker COX1. *Harmful Algae*, 107(June), 102065. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102065>

Stern, R. F., Andersen, R. A., Jameson, I., Küpper, F. C., Coffroth, M. A., Vaultot, D., ... Keeling, P. J. (2012). Evaluating the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a candidate dinoflagellate barcode marker. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042780>

Steven, B., Mccann, S., & Ward, N. L. (2012). Pyrosequencing of plastid 23S rRNA genes reveals diverse and dynamic cyanobacterial and algal populations in two eutrophic lakes. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3), 607–615. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01429.x>

Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Tartar, A., Boucias, D. G., Becnel, J. J., Adams, B. J. (2003). Comparison of plastid 16S rRNA (*rrn16*) genes from *Helicosporidium* spp.: Evidence supporting the reclassification of Helicosporidia as green algae (Chlorophyta). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 1719–1723. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02559-0>

Tesson, S. V. M., Pröschold, T. (2022). Description of *Limnomonas* gen. nov., *L. gaiensis* sp. nov. and *L. spitsbergensis* sp. nov. (Chlamydomonadales, Chlorophyta). *Diversity*, 14(6), 481. <https://doi.org/10.3390/d14060481>

Tesson, S. V. M., Weißbach, A., Kremp, A., Lindström, Å., Rengefors, K. (2018). The potential for dispersal of microalgal resting cysts by migratory birds. *Journal of Phycology*, 54(4), 518–528. <https://doi.org/10.1111/jpy.12756>

UK Centre for Ecology and Hydrology (2023). *Blelham Tarn*.

<https://eip.ceh.ac.uk/apps/lakes/detail.html#wbid=29270> [5. januar 2023]

- Watanabe, S., Tsujimura, S., Misono, T., Nakamura, S., Inoue, H. (2006). *Hemiflagellochloris kazakhstanica* gen. et sp. nov.: A new coccoid green alga with flagella of considerably unequal lengths from a saline irrigation land in Kazakhstan (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 42(3), 696–706. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00214.x>
- Yilmaz, P., Kottmann, R., Pruesse, E., Quast, C., Glöckner, F. O. (2011). Analysis of 23S rRNA genes in metagenomes - A case study from the Global Ocean Sampling Expedition. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(6), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.04.005>
- Zou, S., Bao, Y., Wu, X., Wang, C. (2021). DNA Barcoding Diatoms From China With Multiple Genes. *Frontiers in Marine Science*, 8(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.698331>

## Lisad

### Lisa 1. Uuritud tüved ja nende iseloomustamiseks kasutatud molekulaarsed markerid

Tüved	<i>COI</i>	23S	ITS
Västra Ringsjön			
VR66-02	X	X	X
VR66-04	X	X	X
VR66-05	X	X	X
VR66-07	X	X	X
VR66-10	X	X	X
Ryssbysjön			
R86-45	X	X	X
R86-47	X	X	X
R86-48	X	X	X
R86-51	X	X	X
R86-53	X	X	X
R86-54	X	X	X
R86-56	X	X	X
R129-31	X	X	X
R129-32	X	X	X
R129-33	X	X	X
R129-34	X	X	X
R129-35	X	X	X

R129-36	X	X	X
R129-37	X	X	X
R129-38	X	X	X
R129-39	X	X	X
R129-40	X	X	X
R129-42	X	X	X
Skedviken			
SK147-17	X	X	X
SK147-19	X	X	X
SK147-21	X	X	X
SK147-23	X	X	X
SK147-25	X	X	X
SK147-26	X	X	X
SK147-28	X	X	X
Blelham Tarn			
CCAP 11/119	X	X	X

## Lisa 2. Töös kasutatud praimerid

Marker	<i>Praimeri nimi</i>	<i>Praimeri järjestus (5'-3')</i>	<i>Praimeri nimi</i>	<i>Praimeri järjestus (5'-3')</i>
23S	p23SrV_f 1	GGACAGAAAGACCCTATGAA	p23SrV_ r1	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG
<i>COI</i>	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATA TTGG	HCO219 8	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAA TCA
ITS	ITS-A	GGGATCCGTTTCCGTAGGTGA ACCTGC	ITS-B	GGGATCCATATGCTTAAGTTCAG CGGG

### Lisa 3. Ülevaade saadud DNA järjestuste vastetest NCBI andmebaasis

Tabelis näidatud vasted kehtivad kõikide antud markeri abil saadud DNA järjestuste kohta, kuna ühe markeri abil saadud järjestused olid identsed. Ka Suurbritannia tüve ITS järjestuse puhul olid parimad vasted samad, kuid esinesid väiksed erinevused DNA järjestuste kattuvuse ja sarnasuse protsentides võrreldes Rootsi järvedest pärit järjestuse põhjal tehtud päringuga.

Marker	DNA järjestuste kattuvus (%)	Sarnasus (%)	Taksonoomiline info	Registeerimisnumber
23S	99%	95%	<i>Chlamydomonas geitlerii</i>	L43353.1
	99%	95%	<i>Chlamydomonas geitlerii</i>	X68892.1
	99%	94.17%	<i>Chlamydomonas chlamydogama</i>	NC_068623.1
COI	98%	78.80%	<i>Dunaliella salina</i>	KP691601.1
	72%	74.02%	<i>Chlorella</i> sp.	MK226127.1
	72%	72.69%	<i>Chlorella</i> sp.	KF554428.1
ITS	100%	99.68%	uncultured <i>Chlorophyta</i>	HQ219442.1
	100%	99.52%	uncultured <i>Chlorophyta</i>	HQ219423.1
	69%	83.38%	<i>Chlamydomonas</i> sp.	MN738563.1



**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina, Marlene Kaljumäe

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Rohevetika *Limnomonas gaiensis* iseloomustamine kolme molekulaarse markeri põhjal,

mille juhendaja on Sirje Sildever,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

---

11.01.2023

---

<sup>1</sup> Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.