

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

Sten Anslan

**ITS regiooni kasutatavus hooghännaliste
(*Collembola*) määramisel**

Magistritöö

Juhendaja: Leho Tedersoo, PhD

Tartu 2013

SISUKORD

1. SISSEJUHATUS	3
1.1. Hooghännalised	3
1.2. Mesofauna uurimismeetodid	4
1.3. Triipkoodistamine.....	5
1.4. Töö eesmärgid	6
2. MEETODID	7
2.1. Proovide kogumine	7
2.2. Molekulaarsed meetodid	8
2.3. Sekvencerimine ja järjestuste analüüs	10
3. TULEMUSED	12
3.1. Töö käigus kogutud hooghännaliste liigid	12
3.2. COI vs ITS.....	12
4. ARUTELU	17
4.1. Hooghännalised Eestis	17
4.2. COI vs ITS2.....	17
4.3. ITS2 triipkoodi rakendatavus	19
KOKKUVÕTE.....	22
SUMMARY	23
TÄNUAVALDUS.....	24
KASUTATUD KIRJANDUS	25
LISAD	36
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	40

1. SISSEJUHATUS

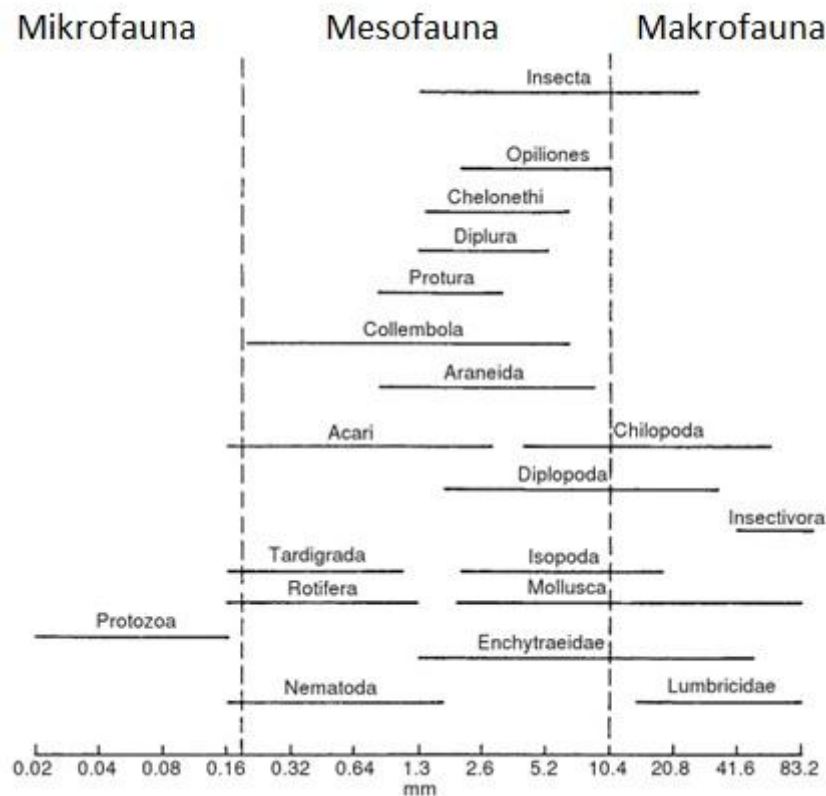
1.1. Hooghännalised

Hooghännalised on üks kõige arvukam lüljalgsete rühm metsa mullas ja varisekihis. Nende kehapiikkus on enamasti 0,2-5 mm ning seetõttu käsitletakse neid mesofauna liikmetena (joonis 1). Valdavalt ulatub nende loomade bioloogiline aktiivsus 10-15 cm sügavusele (Hopkins, 1997). Erinevad hooghännaliste liigid elutsevad ainult teatud kindlas mullakihis või sügavusel ning neil esinevad ka erinevad füsioloogilised ja morfoloogilised kohastumused. Näiteks perekond *Onychiurus* elab sügavamates mullakihtides, tal on taandarenenud jätked, ta on pime ja pigmendita ning tal ei esine hooghännalistele iseloomulikke hüppeharki. Keskmisel mullasügavusel elutseval *Hypogastrura* perekonna liikmetel on lihtsad silmad ja lühikesed jätked ning neil esineb väike hüppehark. Kuid näiteks perekond *Orchesella* liikmetel, kes elavad peamiselt varisekihis, on suuremad silmad, pikemad jätked ning võimas hüppehark (Gullan ja Cranston, 2010).

Üldiselt peetakse hooghännalisi seentoidulisteks, kuid uuringud on näidanud, et nad tarbivad ka vetikaid, baktereid, lagunenuid taimset- ja loomset materjali (Castano-Meneses *et al.*, 2004; Bandyopadhyay *et al.*, 2009). Mitmetest laboratoorsetest ja välikatsetest on leitud, et teatud liigid võivad olla seenetaksonite söömise suhtes valivad (Greenslade *et al.*, 2002; Varga *et al.*, 2002; Jorgensen *et al.*, 2005; Bandyopadhyay *et al.*, 2009). Teatud liigid võivad toidu suhtes olla ka mitteselektiivsed ning sõltuvalt keskkonnast võivad nad kasutada ühte või mitut tüüpi toiduallikat ning isegi lülituda üle kisklusele, kui tingimused seda nõuavad (Castano-Meneses *et al.*, 2004).

Olenevalt ökosüsteemist on hooghännaliste tihedust mullas mõõdetud 100-670 000 isendit ruutmeetri kohta (Petersen ja Luxton, 1982). Neil on tähtis roll lagunemisprotsessides (Cortet *et al.*, 2003) ning oma elutegevusega mõjutavad need lüljalgsed toitainete ringet (Bonkowski *et al.*, 2000), lämmastiku mineralisatsiooni (Filser, 2002), mulla agregatsiooni (Siddiky *et al.*, 2012), taimede kasvu (Klironomos ja Kendrick, 1995; Sabais, 2012), seente biomassi (Bardgett *et al.*, 1993; Tordoff *et al.*, 2008), seente suktsessiooni ja levikut mullas (Lussenhop, 1992; Lilleskov ja Bruns, 2005) ning seeneliikide omavahelisi interaktsioone (Tiunov ja Scheu, 2005). Üldiselt on nende lüljalgsete elurikkust mõjutavad tegurid ja liigiline koosseis suhteliselt uurimata. Maailmas on hooghännalisi kirjeldatud umbes 8000 liiki, kuid arvatakse, et tegelik elurikkus võib ulatuda 50 000 liigini (Emerson *et al.*, 2011).

Eestis leidub teadaolevalt 87 liiki hooghännalisi (Elberg, 1995), kuid vähese uurituse tõttu on nende tegelik liigirikkus kindlasti palju suurem.



Joonis 1. Lihtsustatud mullafauna klassifikatsioon kehapikkuse järgi (Wallwork, 1970; viidatud raamatus Coleman *et al.*, 2004).

1.2. Mesofauna uurimismeetodid

Tavaliselt uuritakse mesofauna kooslusi meetodil, kus isendid eraldatakse mullast Tullgreni leetri, flotatsiooni või otsese sorteerimise teel ning seejärel määratakse isendid mikroskoobi all (Coleman *et al.*, 2004). Kuid selliste meetodite kasutamisel mesofauna koosluste uurimise jaoks esineb mitmeid probleeme. Esiteks, eraldamise meetodid võivad olla üsna väheefektiivsed. On teada, et eraldamise efektiivsus varieerub erinevate taksonite ja mulatüüpide vahel. Arvestades sellega, et mitte ükski neist eraldusmeetoditest ei suuda mullast eraldada kõiki sealseid taksonigruppe, siis on vajalik kasutada mitmeid eraldamise meetodeid, et saada antud mullaproovis mullafauna täielik ülevaade (Petersen ja

Luxton, 1982; Coleman *et al.*, 2004). Teiseks, mullafauna liikide määramine võib olla väga töömahukas ning mullaloomade noorjärgud ei ole sageli liigini määratavad (Hajibabaei *et al.*, 2011). Kolmandaks, mitmetes mullaloomade taksonites on leitud ebakõla morfoloogilise eristamise ja molekulaarse liigikriteeriumi vahel (Cicconardi, 2010; Emerson *et al.*, 2011; Porco *et al.*, 2012; Porco *et al.*, 2013). See viitab krüptiliste liikide – morfoloogiliselt sarnaste, kuid omavahel mitteristuvate, geneetiliselt erinevate liikide – olemasolule. Seetõttu ainult morfoloogilisel teel määramine võib tegelikku liigirikkust alahinnata. Lisaks traditsioonilistele meetoditele tuleks mullafauna uurimistöodes kasuks ka molekulaarsete meetodite rakendamine, mis aitaksid tuvastada tegelikku liigirikkust ning hõlbustaksid ka määramistõid.

1.3. Triipkoodistamine

DNA triipkoodistamine on taksonoomiline meetod, mis kasutab organismi DNA lühikest geneetilist markerit, et määrata antud isendi kuuluvust teatud liiki (Hebert *et al.*, 2003a). Meetodi põhimõte seisneb selles, et antud markeri liigisisene geneetiline varieeruvus on väiksem kui liikidevaheline varieeruvus. Seetõttu on võimalik geneetilist markerit kasutada kui triipkoodi, mis eristab liigikaaslaste teistest taksonitest. See erineb molekulaarsest fülogeneesist, kuna peamine eesmärk ei ole määrata isendi fülogeneetilisi seoseid, vaid määrata antud isend teatud taksonisse. DNA triipkoodistamise marker peaks olema selline, mis esineb kõikides huvipakkuvates taksonites, omaks võimalikult suurt liikidevahelist varieeruvust ning piisavalt väikest liigisisest varieeruvust. Marker peaks olema amplifitseeritav ilma liigispetsiifiliste praimeriteta ning olema piisavalt lühike, et seda saaks hetkel kasutatava tehnoloogia abil lihtsasti sekveneerida (Kress ja Erickson, 2008).

Loomade määramiseks triipkoodi meetodil kasutatakse peamiselt mitokondriaalse DNA tsütokroom c oksüdaasi alamühikut 1 (mtDNA CO1 ehk COI) (Hebert *et al.*, 2003a). Selle umbes 650 aluspaari pikkuse mtDNA geenilõigu jaoks on olemas üldised praimerid, mis võimaldavad sekveneerida COI regiooni enamikult loomadelt (Folmer *et al.*, 1994). Tavaliselt omab ka ribosomaalse DNA ITS2 regioon nukleotiidide erinevust isegi lähedalt seotud liikide vahel. Selle kõrval on konserveerunud piirkondi universaalsete praimerite disainiks ning ITS järjestuse pikkus on suhteliselt lühike võimaldades seda hetkel kasutatava tehnoloogia abil amplifitseerida ja sekveneerida. Mitmed uuringud on näidanud ITS2 potentsiaali loomade,

taimede ja seente taksonoomilises klassifikatsioonis ning fülogeneetilistes analüüsid (Coleman ja Vacquier, 2002; Young ja Coleman, 2004; Schultz *et al.*, 2005; Coleman, 2007; Müller *et al.*, 2007; Wiemers *et al.*, 2009; Krüger ja Gargas, 2009; Keller *et al.*, 2010; Darsouei *et al.*, 2011). Seega on ITS2 sageli efektiivne vahend liikide tuvastamisel (Coleman, 2003; Ben-David *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2010). Lisaks liikidevaheliselt varieeruvatele järjestustele moodustab ITS2 regioon RNA transkriptsiooni käigus sekundaarstruktuuri, mis korreleerub taksonoomilise klassifikatsiooniga (Coleman, 2009). Sekundaarstruktuur pakub lisainformatsiooni ka DNA järjestuste aligneerimiseks (Keller *et al.*, 2010) ning seeläbi on ITS2 regioonist pärit fülogeneetiline informatsioon võrreldav COI regiooniga (Wiemers *et al.*, 2009).

Geeni triipkoodi meetodil on potentsiaalne võimalus koguda suurel hulgal liikide seireandmeid, tehes võimalikuks järgida ja mõõta bioloogilist elurikkust ruumis ja ajas. Aga kui soovime mõõta elurikkust korduvalt ja üle suure ruumilise skaala, siis ainuüksi Sangeri meetodil sekveneerimise kasutamine tuhandete proovide taksonoomiliseks analüüsiks on finantsiliselt ebaefektiivne (Yu *et al.*, 2012). Teise põlvkonna molekulaarsete meetoditega on võimalik edukalt uurida bakteri- ja seenekoosluste struktuuri ja dünaamikat. Kui neid molekulaarseid meetodeid saaks kasutada ka mullafauna uurimisel, siis keskkonnast pärit DNA proove võiks kasutada ka mullafauna mitmekesisuse määramisel koos mikroobidega. Sellisel juhul ei peaks võrdlema tulemusi, mida on saadud väga erinevate meetoditega (Hamilton *et al.*, 2009). COI regioon on näidanud kõige suuremat efektiivsust ainult loomarühmade määramisel, kuid ITS2 markeri abil on võimalik määrata paljusid eukarüootseid rühmi (Yao *et al.*, 2010). Seetõttu oleks ühiste ITS praimeritega potentsiaalselt võimalik samaaegselt määrata mitmesuguseid eukarüootseid rühmi keskkonnaproovidest.

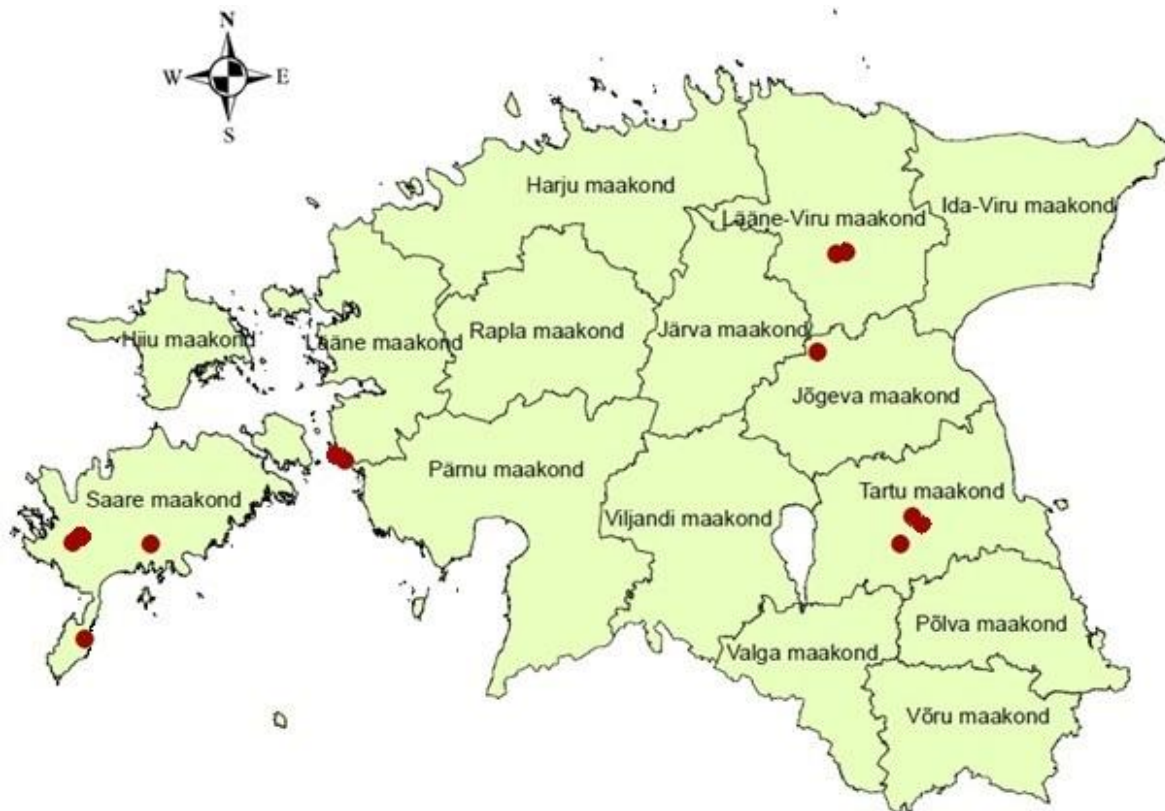
1.4. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks on välja selgitada, kas rDNA ITS2 regioon on kasutatav hooghännaliste määramisel. ITS2 edukus teiste putukarühmade määramisel lubab püstitada hüpoteesi, et ITS2 on kasutatav ka hooghännaliste määramisel.

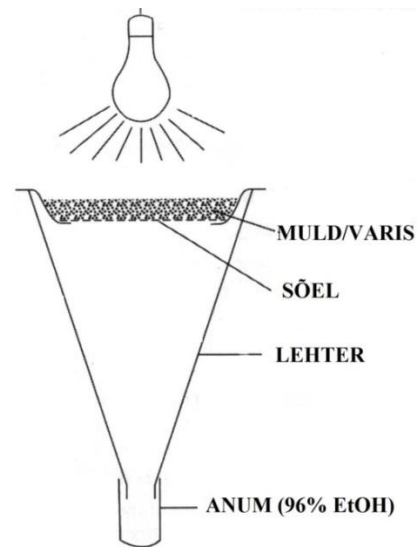
2. MEETODID

2.1. Proovide kogumine

Varise- ja mullaproovid (kuni 10 cm sügavuselt), millest eraldati hooghännalised, olid kogutud 2011. aastal märtsist juulini Eesti erinevatest piirkondadest (joonis 2, lisa 1). Hooghännaliste eraldamiseks kasutati Tullgreni leetri meetodit (joonis 3), eraldusaeg 48 tundi. Isendid säilitati 96% alkoholis ja määrati liigini, mõningal juhul ka perekonna tasemele. Isendide morfoloogilisi tunnuseid vaadeldi valgusmikroskoobiga Nikon Eclipse E100, kasutades kuni 400x suurendust ning määramiseks kasutati A. Fjellbergi poolt koostatud määrajaid (Fjellberg, 1998, 2007).



Joonis 2. Hooghännaliste kogumiseks valitud proovialad Eestis.



Joonis 3. Käesolevas töös hooghännaliste eraldamiseks kasutatud Tullgreni lehtri meetod (Coleman *et al.*, 2004).

2.2. Molekulaarsed meetodid

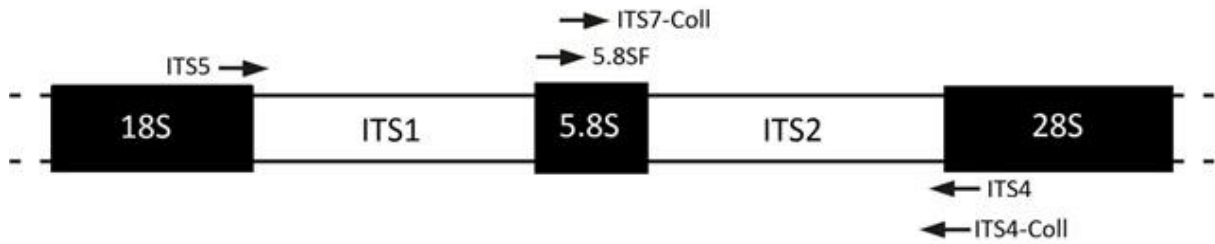
DNA eraldamine toimus lüüsi puhvris (0,8M Tris-HCl, 0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2% w/v Tween-20) (Solis BioDyne, Tartu, Eesti), proteinaas K meetodil (Hogg ja Hebert, 2004) kasutades isendi kogu keha, kuid suuremate isendite (alates 5 mm) puhul lisati lüüsi puhvrise DNA eralduse jaoks üks jalg. DNA eraldamiseks kasutati 100 μl lüüsi puhvrit ja 2,5 μl ensüüm proteinaas K ning seejärel inkubeeriti tuubid 24 h 56 °C juures. Proteinaas K inaktiveerimiseks tõsteti temperatuur 15 minutiks 98 °C. Tuubides olevad koetükid tsentrifuugiti põhja ning lahust pipeteeriti uude tuubi. Kuna sellisel meetodil eralduv DNA molekulide hulk on väga suur, siis polümeraasi ahelreaktsioonis (PCR) kasutati DNA lahuse kümnekordset lahjendust. PCR käigus amplifitseeriti DNA proovidest täispikk ITS lõik (ITS1 – 5.8S – ITS2) (joonis 3), kasutades praimereid ITS5 ja ITS4 (White *et al.*, 1990) (tabel 1). Juhul kui amplifitseerimine praimeritega ITS5 ja ITS4 ebaõnnestus, siis kasutati ITS5 asemel praimerit 5.8SF (Martin ja Rygielwicz, 2005), et amplifitseerida 5.8S – ITS2 regioon. Need praimerid on disainitud seente ITS regiooni amplifitseerimise jaoks ning võivad töötada ka väga madala seene DNA kontsentratsiooni korral. Seetõttu on võimalik, et lisaks

hooghännalise ITS regioonile amplifitseeritakse ka isendi jätkete küljes või maos olevate seente ITS regioon. Juhul kui amplifitseerimise ja sekveneerimise tulemused olid ebakvaliteetsed, kasutati lisaks ka praimereid ITS4-Coll ja ITS7-Coll (tabel 1), mis disainiti selles töös edukalt sekveneeritud hooghännaliste järjestuste alusel. Mitokondriaalse DNA COI lõigu eraldamiseks kasutati selgrootutele disainitud universaalseid praimereid LCO1490 ja HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) (tabel 1, joonis 5).

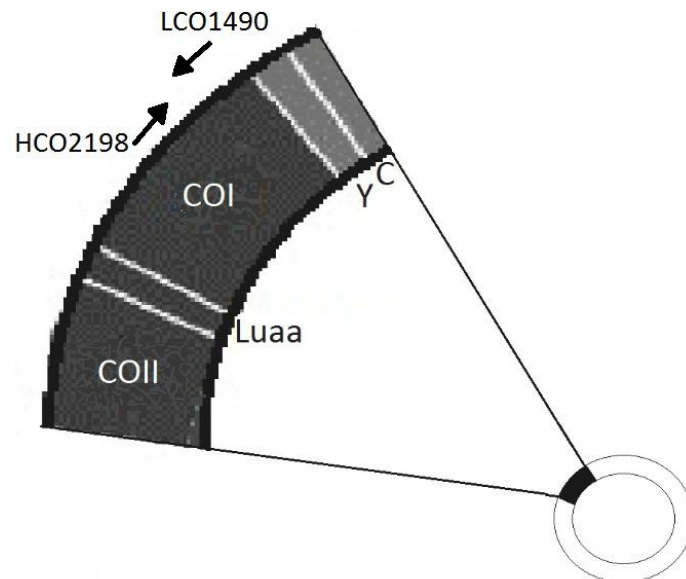
PCR reaktsioon (kokku 25 µl) sisaldas 0,5 µl mõlemat praimerit, 5 µl PCR segu (FirePol Mastermix, Solis BioDyne, Tartu, Eesti), 1 µl 10x lahjendatud DNAd ja steriilset destilleeritud vett. ITS regiooni amplifitseerimiseks kasutati järgmist PCR programmi: 15 min 95 °C; 35 tsüklit 30 sek 95 °C, 30 sek 55 °C, 1 min 72 °C; 10 min 72 °C. COI regiooni amplifitseerimiseks kasutati järgmist PCR programmi: 1 min 94 °C; 5 tsüklit 1 min 94 °C, 1 min 45 °C, 1 min 72 °C; 35 tsüklit 1 min 94 °C, 1 51 °C, 1 min 72 °C; ja 5 min 72 °C (Hogg ja Hebert, 2004). Amplifitseerimise edukust vaadeldi 1% agarosigeelil. PCR produktide puhastamiseks kasutati 1,5 µl nukleaaside ja fosfataasi segu (Exo-SAP, GE Healthcare, Freiburg, Saksamaa), mida inkubeeriti 45 min 37 °C ja 15 min 85 °C.

Tabel 1. Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Järjestus 5' - 3'	Viide
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> , 1994
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> , 1994
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
5.8SF	ATGCATCGATGAAGAACGC	Martin ja Rygiewicz, 2005
ITS7-Coll	GTGAACTGCAGGACACATG	Käesolev töö
ITS4-Coll	GCTTAAATTTAGCGGGTAATC	Käesolev töö



Joonis 4. Ribosomaalse DNA lõik 18S, 28S ja nende vahele jääva ITS (ITS1-5.8S-ITS2) regiooniga. Nooltega on tähistatud praimerite seondumise suunad.



Joonis 5. Mitokondriaalse DNA lõik COI regiooniga (Carapelli *et al.*, 2008). Nooltega on tähistatud praimerite seondumise suunad.

2.3. Sekvenerimine ja järjestuste analüüs

PCR produktid sekveneriti Hollandis, firmas Macrogen. Sekvenerimiseks kasutati primereid ITS5, 5.8SF, ITS-Coll7 ja LCO1490. Juhul kui 5' – 3' suunaliste praimeritega sekvenerimine ei andnud kvaliteetseid tulemusi, siis sekveneriti proovid uuesti praimeritega ITS4, ITS-Coll4, HCO2198. DNA järjestuste kvaliteedikontroll toimus programmi Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA) abil.

Hooghännaliste COI ja ITS järjestused laeti üles plutoF andmebaasi (<http://plutof.ut.ee> – Abarenkov *et al.*, 2010b). DNA järjestused aligneeriti veebipõhise programmiga MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server> – Katoh *et al.*, 2002) ning seejärel vaadeldi programmis Seaview (Gouy *et al.*, 2010). Analüüsis kasutatud ITS2 regiooni piiritleti konservatiivsete 5.8S 3' otsa ja 28S 5' otsa järgi. ITS2 järjestuste kuuluvust lüljalgsetele kontrolliti NCBI GenBank andmebaasis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> – Altschul *et al.*, 1997). Hooghännalistest eraldatud COI järjestuste kuuluvust hooghännalistele kontrolliti BOLD andmebaasi (<http://www.barcodinglife.com> – Ratnasingham ja Hebert, 2007) abil. Kuigi paistab, et hooghännaliste COI järjestused on tavaliselt 658 aluspaari pikad, siis antud töös ebakvaliteetsete 5' ja 3' otsade eemaldamise tõttu kasutati 606 aluspaari pikkuseid järjestusi. COI ja ITS2 liigisiseseid ja liikidevahelisi järjestuste erinevusi analüüsiti programmi *usearch* (Edgar, 2010) abil. Programmiga *usearch* võrreldi järjestusi paarikaupa aligneerimise ja erinevuste tuvastamise teel (kasutades Levenshteini distantssi). *Usearch* väljundi alusel genereeriti vastavad graafikud programmiga Statistica 7 (StatSoft, Tulsa, USA).

3. TULEMUSED

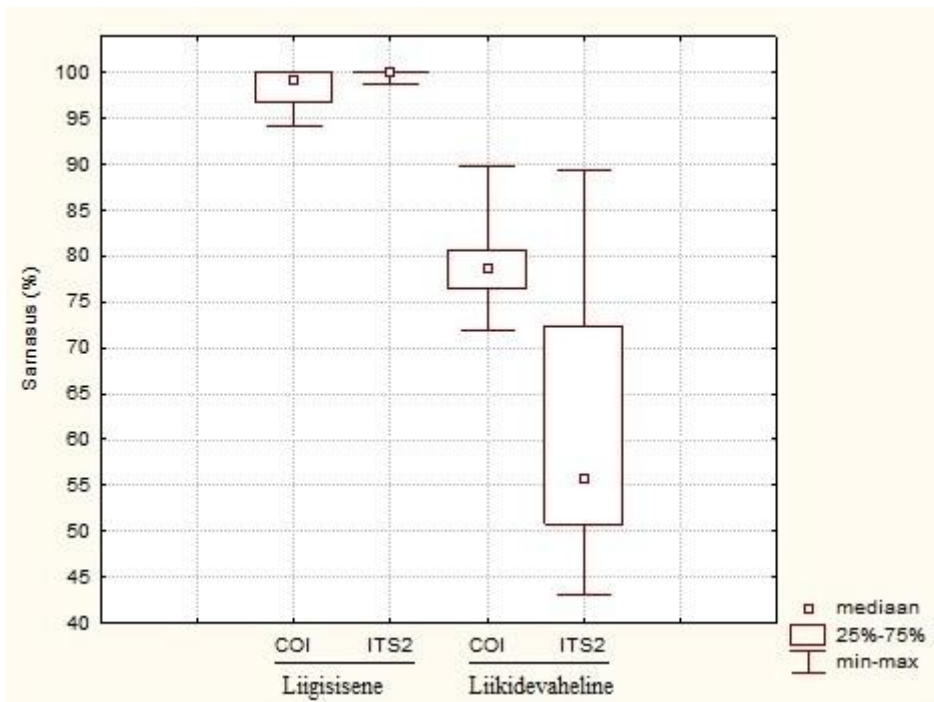
3.1. Töö käigus kogutud hooghännaliste liigid

Käesoleva uurimuse käigus koguti 41 erinevat liiki hooghännalisi. Triipkoodistamise analüüsid kasutati 34 liiki (lisa 2), kuna kõikidest leitud liikidest ei õnnestunud sekveneerimise käigus saada kvaliteetseid COI või ITS järjestusi. Antud töö käigus tuvastati 9 seni Eestis registreerimata hooghännalise liiki (lisa 3).

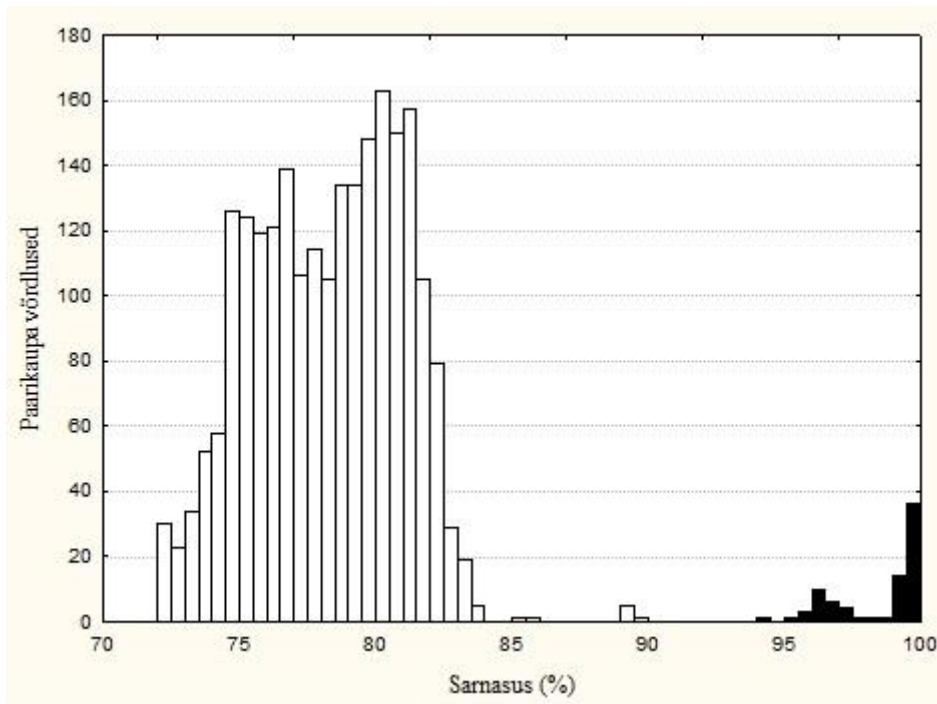
3.2. COI vs ITS

Järgides varem kasutatud COI markeri abil hooghännaliste tuvastamise protokoll (Hogg ja Hebert, 2004) oli universaalsete praimeritega (LCO1490 ja HCO2198, tabel 1) hooghännalise COI regiooni amplifitseerimine suhteliselt edukas. Samuti oli võimalik hooghännaliste ITS2 regiooni amplifitseerida algselt seentele disainitud praimeritega ITS5, ITS4 ja 5.8SF (tabel 1), kuid efektiivsus oli madalam kui COI praimerite puhul. Kuna lüljalgsete maost ja jätkete küljest võib leida seeneeoseid (Lilleskov ja Bruns, 2005), siis universaalsete ITS praimeritega hooghännalise ITS regiooni amplifitseerimisel on potentsiaalne oht amplifitseerida ka seente ITS regioon (Chen *et al.*, 2010), mis takistab kvaliteetse järjestuse sekveneerimist. Hooghännaliste ITS regiooni järjestuste alusel disainitud praimerid ITS7-Coll ja ITS4-Coll (tabel 1) vähendavad seeneliikide amplifitseerimise ohtu ning võrreldes universaalsete ITS praimeritega on ITS-Coll praimerid töökindlamad. Kuid leiti, et ITS7-Coll (5' – GTGAACTGCAGGACACATG – 3') on nukleotiidide järjestuse poolest kattuv sääseliste (*Diptera*) ITS2 regiooni amplifitseerimiseks kasutatava ITS2F praimerid järjestusega (5' – TGTGAACTGCAGGACACATGAA – 3') (Cornel *et al.*, 1996). Lisaks NCBI GenBank andmebaasi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> – Altschul *et al.*, 1997) järjestuste alusel leiti, et ITS7-Coll ning ITS4-Coll praimerijärjestused on identsed ka osade teiste lüljalgsete 5.8S ja 28S piirkonnas asuvate järjestusega. Seega ei ole ITS7-Coll ja ITS4-Coll hooghännaliste-spetsiifilised praimerid, kui sellegipoolest aitavad vältida seeneliikide amplifitseerimist ja seetõttu on need sobilikud praimerid amplifitseerimise ning sekveneerimise jaoks.

Analüüsis kasutati 70 hooghännaliste COI ja ITS2 järjestusi ning kokku võrreldi 34 erinevat liiki. Analüüsis kasutatud järjestuste pikkused olid COI puhul 606, ITS2 puhul 181-410 aluspaari. Järjestuste erinevused olid märkimisväärselt väiksemad liigisisest kui liikidevaheliselt (joonis 5). Iga uuritud liik omas unikaalset COI järjestust ning liigisisene varieeruvus oli vahemikus 0-5,8% (tabel 2). Kõige suurema varieeruvusega olid *Isotoma viridis* ja *Sminthurides* sp., nende liigisisest järjestused näitasid erinevust vastavalt 4,3% ja 5,8%. Kui maksimaalne liigisisene varieeruvus leiti olevat 5,8%, siis kõik liikidevahelised võrdlused näitasid erinevust enam kui 10% (10,2-28,2%). Seega liigisisest ja liikidevaheliste järjestuste lünk (ingl.k. *barcoding gap*) jääb vahemikku 5,8-10,2% (joonis 6).



Joonis 5. Hooghännaliste mtDNA COI ja rDNA ITS2 järjestuste liigisisest ja liikidevahelised varieeruvused.

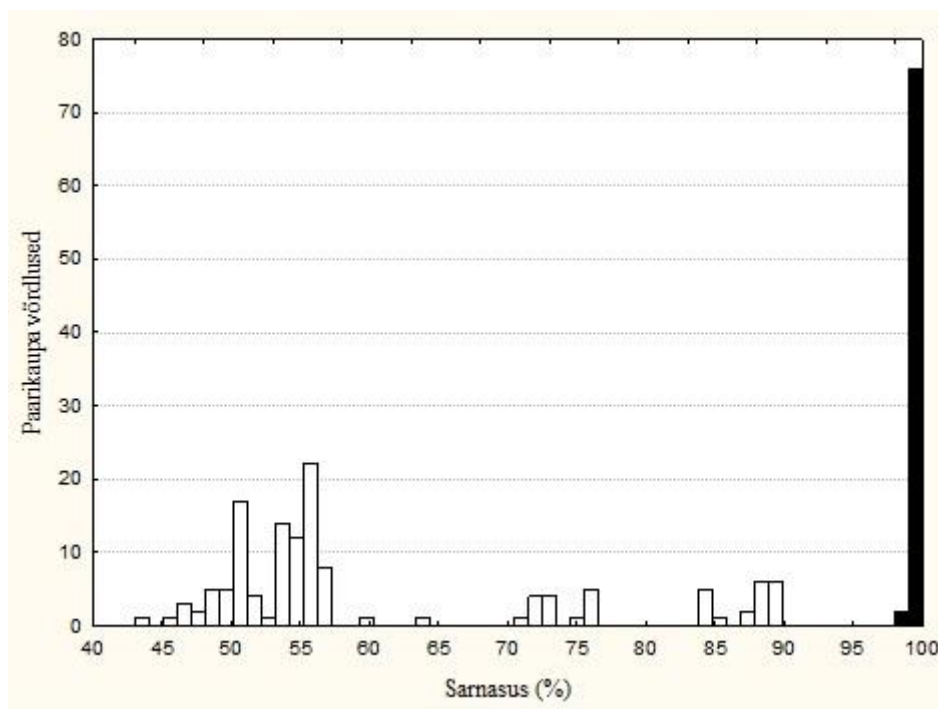


Joonis 6. Hooghännaliste mtDNA COI järjestuste paarikaupa võrdlused sarnasuse alusel. Mustad tulbad tähistavad liigisiseseid ning valged tulbad liikidevahelisi COI järjestuste võrdlusi. Liigisiseste ja liikidevaheliste järjestuste lünk jääb vahemikku 5,8-10,2%.

Tabel 2. Hooghännaliste taksonisestest mtDNA COI järjestuste keskmised erinevused protsentides (sulgudes olev vahemik tähistab minimaalset kuni maksimaalset erinevust protsentides). Liikide arv vähemalt kahe isendiga – n_1 . Perekondade arv vähemalt kahe liigiga – n_2 . Kogu liikide arv – n_3 .

Sugukond	n_1	Keskmine liigisisene erinevus	n_2	Keskmine perekonnasisene erinevus	n_3	Keskmine sugukondadevaheline erinevus
<i>Isotomidae</i>	5	1,4 (0-4,3)	2	14 (10,3-18,9)	9	20,7 (16,2-28)
<i>Entomobryidae</i>	3	1,9 (0-3,8)	3	17,9 (14,4-20)	8	21,2 (16,2-28)
<i>Hypogastruridae</i>	1	0,2	1	18,3 (17,4-19,3)	4	22 (18,3-27,2)
<i>Dicyrtomidae</i>	1	3	0		2	21,8 (18-27,6)
<i>Sminthuridae</i>	1	0,3 (0-0,5)	0		2	22,2 (20,4-28)
<i>Onychiuridae</i>	1	0,4 (0-0,8)	0		2	21,9 (17,1-25,2)
<i>Tomoceridae</i>	1	0,1 (0-0,2)	0		2	20,8 (16,5-26,9)
<i>Neanuridae</i>	0		0		2	23,1 (18,9-20,2)
<i>Sminturididae</i>	1	3,9 (1,3-5,8)	0		1	24,5 (19-28)
<i>Katiannidae</i>	1	1,1	0		1	24,7 (19-27,8)
<i>Neelidae</i>	1	0	0		1	24,7 (22,1-27,2)

Kuigi ITS2 pikkused olid liikidevaheliselt suuresti varieeruvad (181-410 aluspaari), siis liigisisesele oli ITS2 lõigu pikkus väga konservatiivne. Iga uuritud liik omas unikaalset ITS2 järjestust ning liigisisene varieeruvus oli peaaegu kõikidel juhtudel < 1% (tabel 3). Kõige kõrgema varieeruvusega olid *Sminthurinus* sp. ja *Entomobrya nivalis* – nende järjestused näitasid liigisisese erinevust vastavalt 1,1% ja 1,2%. Seevastu *Sminthurinus* sp. isendid olid COI järjestuste alusel identsed ja *Entomobrya nivalis* isendite vahel oli erinevus 0,3%. Kui COI järjestuste alusel näitas kõige suuremat varieeruvust *Sminthurides* sp., siis ITS2 järjestused olid maksimaalse erinevusega 0,5%. ITS2 regiooni taksonitevahelised võrdlused osutusid üldiselt palju erinevamaks kui võrdlused COI regiooniga (joonis 5). Seda tõenäoliselt ITS2 järjestuste pikkuste liikidevaheliste erinevuste tõttu. Kuid kõik liikidevahelised võrdlused olid ka ITS2 puhul suuremad kui 10% ning leiti, et liigisiseste ja liikidevaheliste järjestuste lünk jääb vahemikku 1,2-10,7% (joonis 7).



Joonis 7. Hooghännaliste rDNA ITS2 järjestuste paarikaupa võrdlused sarnasuse alusel. Mustad tulbad tähistavad liigisiseseid ning valged tulbad liikidevahelisi ITS2 järjestuste võrdlusi. Liigisiseste ja liikidevaheliste järjestuste lünk jääb vahemikku 1,2-10,7%.

Tabel 3. Hooghännaliste taksonisise rDNA ITS2 järjestuste keskmised erinevused protsentides (sulgudes olev vahemik tähistab minimaalset kuni maksimaalset erinevust protsentides). Liikide arv vähemalt kahe isendiga – n_1 . Perekondade arv vähemalt kahe liigiga – n_2 . Kogu liikide arv – n_3 .

Sugukond	n_1	Keskmine liigisisene erinevus	n_2	Keskmine perakonnasisene erinevus	n_3	Keskmine sugukondadevaheline erinevus
<i>Isotomidae</i>	5	0,08 (0-0,4)	2	18,7 (10,7-49,5)	9	>57
<i>Entomobryidae</i>	3	0,6 (0-1,2)	3	26,5 (12,7-53,2)	8	>57
<i>Hypogastruridae</i>	1	0	1	46,5 (36,3-54,4)	4	46,8 - >57
<i>Dicyrtomidae</i>	1	0,6	0		2	>57
<i>Sminthuridae</i>	1	0	0		2	27,1 - >57
<i>Onychiuridae</i>	1	0,2 (0-0,5)	0		2	>57
<i>Tomoceridae</i>	1	0,3 (0-0,6)	0		2	>57
<i>Neanuridae</i>	0		0		2	46,8 - >57
<i>Sminturididae</i>	1	0,3 (0-0,5)	0		1	>57
<i>Katiannidae</i>	1	1,1	0		1	27,1 - >57
<i>Neelidae</i>	1	0	0		1	>57

Hooghännaliste ITS2 järjestuste paarikaupa võrdluste jooniselt (joonis 6) on näha, et paarikaupa võrdluste arv on palju väiksem kui COI järjestuste paarikaupa võrdluste joonisel (joonis 5). Kuna ITS2 järjestuste pikkus varieerus liikidevaheliselt suurel määral, siis paarikaupa võrdlused osutusid sageli väga erinevaks. Suure erinevuse tõttu ei viidud paarikaupa võrdlusi läbi (kasutades programmi *usearch* (Edgar, 2010)), kui järjestused erinesid rohkem kui 57%. Seetõttu on joonisel 6 esitatud võrdluste arv väiksem kui joonisel 5 ning ka hooghännaliste taksonisise ITS2 järjestuste erinevuste tabelisse (tabel 3) on märgitud mõningal juhul erinevuseks > 57%.

4. ARUTELU

4.1. Hooghännalised Eestis

Varasem kokkuvõte Eestis esinevatest hooghännalistest toob välja, et Eestis on registreeritud 87 liiki hooghännalisi (Elberg, 1995). Vähesel uurituse tõttu on liigirikkus kindlasti suurem, kuna antud töö käigus leiti proovialadelt kokku 9 seni Eestis kirjeldamata liiki (lisa 2). Hooghännalised asustavad väga mitmesuguseid maapealseid elupaiku, isegi inimtekkelisi elupaiku (Fjellberg, 1998). Proovialad hõlmasid peamiselt metsamulla ja varisekihi elupaiku võrdlemisi vähestes taimekooslustes tüüpides ning seega võiks tõenäoliselt leida veel paljusid siinsetel aladel kirjeldamata liike. Teadaolevast suuremat liigirikkkust võib aimata ka vaadates naaberriikide hooghännaliste nimestikku. Nimelt Soomes on kirjeldatud 142 (Huhta *et al.*, 2010) ning Lätis 197 hooghännalise liiki (Jucevica, 2003).

4.2. COI vs ITS2

DNA markerite järjestuse erinevused olid liikidevaheliselt palju suuremad kui liigisisel ja kõikidel juhtudel oli võimalik edukalt eristada hooghännaliste liike nii COI kui ka ITS2 järjestuste alusel. Kui suur peaks järjestuste erinevus kahe isendi vahel olema, et määrata nende kuuluvust erinevatesse liikidesse? Mitokondriaalse DNA COI geeni põhjal on selgrootutele väljapakutud erinevuseks 3% (Hebert *et al.*, 2003a). Käesolevas töös leiti, et hooghännaliste puhul oli COI järjestuste liigisisene erinevus kuni 5,8%, mistõttu morfoloogilise määramise teel määratud üks liik võiks COI järjestuste alusel jaguneda kaheks liigiks. Ent ITS2 järjestuste alusel oli kõne all oleva liigi varieeruvus kõigest 0,5%, mis on jällegi kooskõlas morfoloogilise määramisega. Hooghännaliste COI järjestuste erinevused paistavad olema suuremad kui üldiselt teistel loomadega (Hogg ja Hebert, 2004). Näiteks on leitud liblikaliste (*Lepidoptera*) perekonnasiseseks keskmiseks erinevuseks 6,8% (Hebert *et al.*, 2003b), kuid hooghännaliste puhul oli perekonnasisene erinevus keskmiselt 16,7% ning 19% (Hogg ja Hebert, 2004). Seetõttu on hooghännaliste puhul soovitatud liikidevaheliseks eristamise piiriks võtta 8% erinevus (Hogg ja Hebert, 2004). Sellise kriteeriumi järgi olid eristatavad kõik antud töös uuritud hooghännalised ning ka lähedalt seotud liikide vahel esines vähemalt 10-protsendiline erinevus. Antud töö tulemused on kooskõlas eelnevate

töödega, mis näitavad, et COI regioon on tõhus eristamiseks hooghännaliste liike (Stevens ja Hogg, 2003; Hogg ja Hebert, 2004).

On leitud, et ITS2 regioonil on loomariigi isendite määramisel üldiselt kõrge edukuse määr (Yao *et al.*, 2010). ITS2 regiooni on kasutatud edukalt näiteks võrgendilestlaste (*Tetranychidae*) (Ben-David *et al.*, 2007), kiletiivaliste (*Hymenoptera*) (Pinto *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2010), kahetiivaliste (*Diptera*) (Young ja Coleman, 2004; Marinho *et al.*, 2011), lestade (*Acari: Astigmata*) (Yang *et al.*, 2011) ja imiusside (*Trematoda*) (Prasad *et al.*, 2009) määramisel. Käesolevas töös leiti, et ITS2 regiooni abil on võimalik edukalt eristada ka hooghännaliste liike. ITS2 regiooni puhul on kasutatud liikide eristamise kriteeriumina järjestustevahelist erinevust 2% (Ben-David *et al.*, 2007), kuid seda võrgendilestlaste (*Tetranychidae*) puhul. Ka teistes töödes on leitud, et ITS2 liigisisene varieeruvus on väga väike ja ei ületa 2% (Li *et al.*, 2010; Marinho *et al.*, 2011). Antud töös leiti, et hooghännaliste maksimaalne liigisisene varieeruvus on 1,2% ning seetõttu võiks liike grupeerida 98% sarnasuse alusel. Sarnaselt on ka teistes uurimistöodes tuvastatud ITS2 järjestuste väiksemat liigisisest varieeruvust võrreldes COI järjestustega (Darsouei *et al.*, 2011; Kornobis ja Palsson, 2012; Kvie *et al.*, 2013). Mitokondriaalse DNA COI regiooni kõrgem varieeruvus võrreldes ribosomaalse DNA ITS regiooniga võib tuleneda sellest, et COI regioon omab suuremat evolutsioonilist kiirust (Avice, 1986). Liigisiseste ja liikidevaheliste järjestuste lünk jäi vahemikku 1,2-10% ning suuremamahuline, erinevatest geograafilistest piirkondadest pärit uuringud oleksid vajalikud täpsema liigisisese varieeruvuse tuvastamiseks.

Kui COI puhul oli maksimaalne liigisisene erinevus 5,8%, siis ITS2 puhul oli samade isendite vahel varieeruvus tunduvalt väiksem – 0,5%. Suure liigisisese varieeruvuse tõttu (COI puhul) võiks arvata, et erinevused võivad tuleneda isendite päritolust erinevatest populatsioonidest. Eelnevates uurimistöödes on näidatud, et liigisisese ITS2 ja COI varieeruvused võivad peegeldada isendite regionaalset kuuluvust (Cognato *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2009), kuid antud töös sellist seost ei tuvastatud. Seda isegi siis kui Eestist pärit isendite järjestusi võrreldi BOLD andmebaasis (<http://www.barcodinglife.com> – Ratnasingham ja Hebert, 2007) olevate järjestustega. Hooghännaliste ITS2 järjestuste alaeesinduse tõttu oli viimasel juhul võrdlusi võimalik teha ainult COI järjestustega. Seega COI regioon paistab olevat erinevatest kohtadest pärit hooghännaliste seas väga konserveerunud. Tõenäoliselt on seda ka ITS2 regioon, kuna samast piirkonnast pärit hooghännaliste seas esines mõningal juhul isegi suurem järjestuste varieeruvus võrreldes 260 kilomeetri kauguselt pärit isenditega (andmeid ei ole näidatud).

Kuigi COI ja ITS2 regioonid on kasulikud liikide tuvastamise eesmärgil, peab järjestuste omandamises liigile siiski tähelepanelik olema. Nimelt universaalsete mtDNA praimeritega on võimalik amplifitseerida ja järjestada lüljalgsete endosümbiontseid baktereid (perekond *Wolbachia*), isegi kui määramiseks kasutatakse ainult isendi jalga (Smith *et al.*, 2012). Seega võib endosümbiontse bakteriga nakatus ohustada mtDNA põhise määramise täpsust triipkoodistamise meetodi kaudu. Käesolevas töös tuvastati ainult mõnel üksikul korral, et amplifitseeritud ja sekveneeritud järjestus ei kuulunud hooghännalisele. ITS2 on laialt kasutatav marker seeneliikide tuvastamisel (Schoch *et al.*, 2012) ning kuna paljude lüljalgsete maost ja jätkete küljest võib leida seeneeoseid (Lilleskov ja Bruns, 2005), siis selgrootute määramisel ITS2 abil on potentsiaalne oht seentejärjestuste reostus (Chen *et al.*, 2010). Amplifitseerides hooghännaliste ITS2 regiooni praimeritega ITS5, ITS4 ja 5.8SF (tabel 1), tuvastati ainult ühel juhul, et amplifitseeritud ja sekveneeritud ITS2 järjestus kuulus seeneliigile. Kuid antud töös disainitud praimeritega ITS7-Coll ja ITS4-Coll (tabel 1) oli hooghännalise ITS2 regioon amplifitseerimine ja sekveneerimine edukas. Kui ainult ühel juhul tuvastati, et ITS5, ITS4 ja 5.8SF praimeritega amplifitseeriti ja sekveneeriti seeneliigi ITS2 piirkond, siis rohkem esines ebakvaliteetseid järjestusi. Viimased olid tingitud ilmselt asjaolust, et DNA lüüsi puhvris eraldus lisaks sihtgrupi DNAle ka hooghännalise maos või jätkete küljes olnud seene DNA, mis PCR käigus samuti amplifitseerus ning seetõttu sekveneerimist segas. Sellistest DNA segudest õnnestus hooghännaliste ITS2 regiooni paremini amplifitseerida ja järjestada praimeritega ITS7-Coll ja ITS4-Coll, aga seda mitte 100-protsendilise eduga. Kuid DNA järjestuste hoolikal analüüsil on võimalik potentsiaalset reostust siiski tuvastada ning seetõttu soovimatu endosümbiontse bakteri või seeneliigi järjestuse omastamist huvipakkuvale isendile vältida.

4.3. ITS2 triipkoodi rakendatavus

Tavaliselt uuritakse mullaloomade kooslusi eraldiseisvalt mulla mikroobikooslustest, kuna kasutatavad uurimismeetodid on olnud erinevad. Mikroobide uurimine molekulaarsete meetodite abil on suhteliselt levinud ning teise põlvkonna sekveneerimismeetoditega on võimalik mulla mikroobikoosluste kohta koguda suhteliselt lühikese ajaga väga suurtes kogustes andmeid (Chen *et al.*, 2010). Kuid mullaloomade kooslusi on uuritud tavaliselt meetoditel, kus isendid kõigepealt eraldatakse mullast ja seejärel määratakse mikroskoobi abil (Coleman *et al.*, 2004). Leidub vaid väheseid töid, kus mullaloomade kooslusi on uuritud teise

põlvkonna molekulaarsete meetodite abil (Hamilton *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Epp *et al.*, 2012). Mullafauna uurijad sageli ei tunnegi huvi mullaloomadega koosinevate mikroobide vastu ning mullafauna koosluste uurimiseks kasutatakse või disainitakse teatud loomarühmale spetsiifilisi praimereid. Kui mullaproovist on eraldatud sealsete organismide DNA, siis oleks teoreetiliselt võimalik tuvastada kahe eralditehtava amplifitseerimise käigus nii mikroobsed kui ka loomsed organismid (kasutades erinevate rühmade spetsiifilisi praimereid). Kuna ITS2 on laialt kasutatav marker seeneliikide tuvastamisel (Schoch *et al.*, 2012), siis oleks võimalik näiteks üks amplifitseerimine teha ITS praimeritega ning mullaproovist eraldatud DNAST teine amplifitseerimine teha aga COI regiooni praimeritega. Viimaste abil on küll edukalt tuvastatud erinevat liiki putukate DNA segust sealseid putukaliike (Hajibabaei *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012), kuid COI regioonile on väga raske disainida taksonispetsiifilisi praimereid ning on leitud, et universaalsete COI praimeritega mullaproovi DNAST eukarüootide COI järjestuste amplifitseerimine on väga madala edukusega. Amplifitseerides mullaproovi DNAD universaalsete COI praimeritega leiti, et kogu andmetest kuulusid kõigest 0,96% järjestusi eukarüootidele (Yang *et al.*, 2013). Seega ei ole COI markerid mullaloomade tuvastamiseks sobilikud. Mullaloomade uurimisel on kasutatud ka rDNA 18S regiooni praimereid (Hamilton *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009), mis selektiivselt amplifitseerivad mitmesuguseid loomarühmi. Kuid tavaliselt ei võimalda selle regiooni markeritega määrata organisme liigi tasemele (Machida ja Knowlton, 2012; Bik *et al.*, 2012). Samuti on võimalik 18S markerite abil uurida mullaseente kooslusi, kuid järjestused ei ole seenerühma liikide vahel piisavalt varieeruvad ja seega koosluste uuringud peavad jääma sageli liigist kõrgemale taksonoomilisele tasemele (Rousk *et al.*, 2010). COI regiooni abil seente määramine toimib suhteliselt hästi ainult mõnes seeneperekonnas (näiteks *Penicillium*), kuid enamasti ei võimalda see paljude seeneliikide eristamist (Schoch *et al.*, 2012).

Seega mullafauna ja eukarüootsete mikroobide samaaegsel uurimisel on takistuseks universaalsete praimerite olemasolu, mis oleksid võimalised amplifitseerima nii mikroobide kui ka mullaloomade DNA piirkondi. Kui COI regioon on näidanud kasutatavust ainult loomarühmade määramisel, siis ITS regioon on näidanud liikide eristamise võimet eukarüootide rühmas laiemalt (Yao *et al.*, 2010). Ühiste ITS praimeritega oleks mullaproovist võimalik samaaegselt määrata mitmeid eukarüootirühmi. Näiteks O'Brien *et al.* (2005) leidsid oma mükoloogilises uurimustöös, et ITS praimeritega oli amplifitseeritud ja sekveneeritud ka teisi eukarüootseid organisme.

Antud töös leiti, et ITS2 on kasutatav hooghännaliste määramisel. Kuna hooghännalised on tihedalt seotud seenekooslustega ning ka mullaseente tuvastamiseks

sobivad ITS markerid, siis on potentsiaalselt võimalik samast mullaproovist tuvastada koos nii seente kui ka hooghännaliste liike. Lisaks hooghännalistele on võimalik tuvastada ka teisi mullaloomi, kuna ITS2 markeriga on võimalik määrata tegelikult paljusid eukarüootide rühmasid (Yao *et al.*, 2010). Mullaloomade ja -mikroobide samaaegne uurimine võiks võimaldada paremini tundma õppida loomade ja mikroobide suhteid toiduahela kontekstis. Näiteks oleks võimalik tuvastada hooghännaliste ja seeneliikide vahelisi kooslusemustreid. Sellest tulenevalt võib püstitada hüpoteese hooghännaliste seene-eelistuse kohta ja neid kontrollida näiteks uurides hooghännalise mao sisu või väljaheiteid. Kui seente ja hooghännaliste tuvastamiseks saab kasutada samu geneetilisi markereid, siis molekulaarsete meetoditega mao sisu või väljaheidetes leiduvate seeneliikide määramisel saaks samaaegselt tuvastada ka isendi, kelle kohta uuringut tehakse (Seeber *et al.*, 2010). See teeb võimalikuks tuvastada ka hooghännaliste rolli mullas elavate seente levitajatena. Seente levitamist puudutavaid aspekte käsitlebki edaspidine uurimustöö.

KOKKUVÕTE

ITS regiooni kasutatavus hooghännaliste (*Collembola*) määramisel

Hooghännalised on üks kõige arvukam lüljalgsete rühm metsa mullas ja varisekihis, mistõttu on neil tähtis roll lagunemisprotsessides ja ökosüsteemi toitainete dünaamikas. Traditsiooniliste meetoditega hooghännaliste uurimine on väga töömahukas ning sageli võib ainult morfoloogilisel teel määramine tegelikku liigirikkust alahinnata. Geeni triipkoodi meetodil on potentsiaalne võimalus koguda suurel hulgal liikide seireandmeid, tehes võimalikuks järgida ja mõõta bioloogilist elurikkust ruumis ja ajas. Loomade triipkoodistamiseks on soovitatud kasutada mtDNA COI regiooni, kuid rDNA ITS2 regioon on kasutatav nii loomade, eukarüootsete mikroobide kui ka taimede määramisel. COI regioon on sobilik ainult loomarühmade määramisel, kuid ühiste ITS praimeritega on potentsiaalselt võimalik mullaproovidest määrata samaaegselt mitmesugused eukarüootide rühmad liigi tasemele.

Käesoleva töö eesmärgiks on välja selgitada, kas rDNA ITS2 regioon on rakendatav hooghännaliste määramisel. Tulemused näitavad, et liikidevahelised järjestuste erinevused olid alati suuremad kui liigisisese erinevused ning ITS2 sobib hooghännaliste määramiseks sama hästi kui üldkasutatav COI regioon. Kuna ITS2 on ka seeneliikide määramisel üldkasutatav marker, siis edasised uuringud on vajalikud tuvastamiseks, kas ITS2 regiooni rakendatavus hooghännaliste määramisel võimaldab ühest mullaproovist samaaegselt määrata nii sealseid seente kui ka hooghännaliste liike.

SUMMARY

The use of ITS markers for springtail (*Collembola*) identification

Sten Anslan

Springtails are one of the most abundant arthropods in forest soil and litter layer. Due to their high abundance they have an important role in decomposition processes and ecosystem nutrient dynamics. Studying springtails with traditional methods can be very laborious and identification only by means of morphological traits could underestimate the true diversity. The DNA barcoding method has a potential to provide large amounts of species-level monitoring data, making it possible to track and measure biodiversity over space and time. Although mtDNA COI region has been proposed as a standard DNA barcode for animals, the rDNA ITS2 region has proven efficient to distinguish between animal, eukaryotic microbes and plant species. The COI region is mostly capable of distinguishing between animal species. Using the ITS markers it would be potentially possible to identify a wide range of eukaryotes from the soil sample at the same time.

The aim of the present study was to elucidate if rDNA ITS2 region is applicable for identification of springtail species. The results show that interspecies variability was always greater than intraspecies variability. Therefore ITS2 suits for identification of springtail species as well as the standard COI marker. Because ITS2 is a widely used marker for identification of fungi, further studies are needed to ascertain if the use of ITS2 for identification of springtails would make it possible to identify both groups at the same time from the same soil samples.

TÄNUAVALDUS

Suur tänu juhendajale, Leho Tedersoole, ideede, soovitude, paranduste ja igakülge abi eest töö valmimisel. Tänu ka kõigile teistele abivalmis mükoloogia õppetooli inimestele!

KASUTATUD KIRJANDUS

Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Hoiland, K., Kjoller, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.F.S., Tedersoo, L., Ursing, B.M., Vralstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., Koljalg, U., 2010a. The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist* 186, 281-285.

Abarenkov, K., Tedersoo, L., Nilsson, R.H., Vellak, K., Saar, I., Veldre, V., Parmasto, E., Proux, M., Aan, A., Ots, M., Kurina, O., Ostonen, I., Jøgeva, J., Halapuu, S., Poldmaa, K., Toots, M., Truu, J., Larsson, K.-H., Koljalg, U., 2010b. PlutoF-a Web Based Workbench for Ecological and Taxonomic Research, with an Online Implementation for Fungal ITS Sequences. *Evolutionary Bioinformatics* 6, 189-196.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.

Avise, J.C., 1986. Mitochondrial-DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 312, 325-342.

Bandyopadhyay, P.K., Khatun, S., Chatterjee, N.C., 2009. Isolation of gut fungi and feeding behavior of some selected soil. *Asian Journal of Experimental Sciences* 23, 253-259.

Bardgett, R.D., Whittaker, J.B., Frankland, J.C., 1993. The effect of collembolan grazing on fungal activity in differently managed upland pastures - a microcosm study. *Biology and Fertility of Soils* 16, 255-262.

Ben-David, T., Melamed, S., Gerson, U., Morin, S., 2007. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (*Acari: Tetranychidae*). *Experimental and Applied Acarology* 41, 169-181.

Bik, H.M., Porazinska, D.L., Creer, S., Caporaso, J.G., Knight, R., Thomas, W.K., 2012. Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 27, 233-243.

Bonkowski, M., Cheng, W.X., Griffiths, B.S., Alpei, G., Scheu, S., 2000. Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *European Journal of Soil Biology* 36, 135-147.

Carapelli, A., Comandi, S., Convey, P., Nardi, F., Frati, F., 2008. The complete mitochondrial genome of the Antarctic springtail *Cryptopygus antarcticus* (*Hexapoda: Collembola*). *BMC Genomics* 9: 315.

Castano-Meneses, G., Palacios-Vargas, J.G., Cutz-Pool, L.Q., 2004. Feeding habits of *Collembola* and their ecological niche. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México Serie Zoología* 75, 135-142.

Chen, X.Y., Daniell, T.J., Neilson, R., O'Flaherty, V., Griffiths, B.S., 2010. A comparison of molecular methods for monitoring soil nematodes and their use as biological indicators. *European Journal of Soil Biology* 46, 319-324.

Cicconardi, F., Nardi, F., Emerson, B.C., Frati, F., Fanciulli, P.P., 2010. Deep phylogeographic divisions and long-term persistence of forest invertebrates (*Hexapoda: Collembola*) in the North-Western Mediterranean basin. *Molecular Ecology* 19, 386-400.

Cognato, A.I., Gillette, N.E., Bolanos, R.C., Sperling, F.A.H., 2005. Mitochondrial phylogeny of pine cone beetles (*Scolytinae, Conophthorus*) and their affiliation with geographic area and host. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36, 494-508.

Coleman, A.W., 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 19, 370-375.

Coleman, A.W., 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* 35, 3322-3329.

Coleman, A.W., 2009. Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50, 197-203.

Coleman, A.W., Vacquier, V.D., 2002. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: A test case for abalone (*Haliotis*). *Journal of Molecular Evolution* 54, 246-257.

Coleman D. C., Crowsley Jr. D. A., Hendrix P. F., 2004. *Fundamentals of Soil Ecology*, 2nd edition. Elsevier Academic Press.

Cornel, A.J., Porter, C.H., Collins, F.H., 1996. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (*Diptera: Culicidae*) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *Journal of Medical Entomology* 33, 109-116.

Cortet, J., Joffre, R., Elmholt, S., Krogh, P.H., 2003. Increasing species and trophic diversity of mesofauna affects fungal biomass, mesofauna community structure and organic matter decomposition processes. *Biology and Fertility of Soils* 37, 302-312.

Darsouei, R., Karimi, J., Awal, M.M., 2011. First record of *Aphelinus paramali* Zehavi and Rosen 1989 (*Hymenoptera, Aphelinidae*), parasitoid of *Aphis pomi* de Geer (*Hemiptera, Aphididae*) in Iran, and its phylogenetic position based on sequence data of ITS2 and COI genes. *Entomological Research* 41, 194-200.

Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460-2461.

Elberg, K., 1995. *Maismaaselgrootud*. – Rmt.: Raukas, A. (koost.) Eesti. Loodus. Tallinn. lk. 443.

Emerson, B.C., Cicconardi, F., Fanciulli, P.P., Shaw, P.J.A., 2011. Phylogeny, phylogeography, phylobetadiversity and the molecular analysis of biological communities. *Royal Society Philosophical Transactions Biological Sciences* 366, 2391-2402.

Epp, L.S., Boessenkool, S., Bellemain, E.P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T., Erseus, C., Gusarov, V.I., Edwards, M.E., Johnsen, A., Stenoien, H.K., Hassel, K., Kauserud, H.,

Yoccoz, N.G., Brathen, K., Willerslev, E., Taberlet, P., Coissac, E., Brochmann, C., 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology* 21, 1821-1833.

Filser, J., 2002. The role of *Collembola* in carbon and nitrogen cycling in soil. *Pedobiologia* 46, 234-245.

Fjellberg, A., 1998. The *Collembola* of Fennoscandia and Denmark. Part 1: *Poduromorpha*. *Fauna Entomologica Scandinavica* 35, 1-183.

Fjellberg, A., 2007. The *Collembola* of Fennoscandia and Denmark. Part II: *Entomobryomorpha* and *Symphyleona*. *Fauna Entomologica Scandinavica* 42, 1-264.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294-299.

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 27, 221-224.

Greenslade, P., Simpson, J.A., Grgurinovic, C.A., 2002. *Collembola* associated with fungal fruit-bodies in Australia. *Pedobiologia* 46, 345-352.

Gullan, P.J., Cranston, P.S., 2010. *The insects: an outline of entomology*. Fourth edition. Wiley-Blackwell, UK.

Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G.A.C., Baird, D.J., 2011. Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. *Plos One* 6.

Hamilton, H.C., Strickland, M.S., Wickings, K., Bradford, M.A., Fierer, N., 2009. Surveying soil faunal communities using a direct molecular approach. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 1311-1314.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270, 313-321.

Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270, 96-99.

Hopkins, SP., 1997. *Biology of Springtails (Insect: Collembola)*. Oxford University Press, Cambridge, UK.

Huhta, V., Siira-Pietikäinen, A., Penttinen, R., Rätty, M., 2010. Soil fauna of Finland: *Acarina, Collembola* and *Enchytraeidae*. *Memoranda Societatis Fauna Flora Fennica*, 86: 59-82.

Hogg, I.D., Hebert, P.D.N., 2004. Biological identification of springtails (*Hexapoda: Collembola*) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 82, 749-754.

Jorgensen, H.B., Johansson, T., Canback, B., Hedlund, K., Tunlid, A., 2005. Selective foraging of fungi by collembolans in soil. *Biology Letters* 1, 243-246.

Jucevica, E., 2003. Nomina *Collembola* Latviae. *Latvijas Entomologs*, 40: 16-20.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30, 3059-3066.

Keller, A., Forster, F., Muller, T., Dandekar, T., Schultz, J., Wolf, M., 2010. Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. *Biology Direct* 5, 4.

- Klironomos, J.N., Kendrick, W.B., 1995.** Stimulative effects of arthropods on endomycorrhizas of sugar maple in the presence of decaying litter. *Functional Ecology*, 528-536.
- Kornobis, E., Palsson, S., 2012.** Discordance in Variation of the ITS Region and the Mitochondrial COI Gene in the Subterranean Amphipod *Crangonyx islandicus*. *Journal of Molecular Evolution* 73, 34-44.
- Kress, W.J., Erickson, D.L., 2008.** DNA barcoding - a windfall for tropical biology? *Biotropica* 40, 405-408.
- Krüger, D., Gargas, A., 2008.** Secondary structure of ITS2 rRNA provides taxonomic characters for systematic studies - a case in *Lycoperdaceae* (*Basidiomycota*). *Mycological Research* 112, 316-330.
- Kvie, K.S., Hogner, S., Aarvik, L., Lifjeld, J.T., Johnsen, A., 2013.** Deep sympatric mtDNA divergence in the autumnal moth (*Epirrita autumnata*). *Ecology and Evolution* 3, 126-144.
- Li, Y., Zhou, X., Feng, G., Hu, H., Niu, L., Hebert, P.D.N., Huang, D., 2010.** COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (*Hymenoptera, Eurytomidae*). *Molecular Ecology Resources* 10, 31-40.
- Lilleskov, E.A., Bruns, T.D., 2005.** Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs. *Mycologia* 97, 762-769.
- Lussenhop, J., 1992.** Mechanisms of microarthropod microbial interactions in the soil. *Advances in Ecological Research*, 23, 1-33.
- Machida, R.J., Knowlton, N., 2012.** PCR Primers for Metazoan Nuclear 18S and 28S Ribosomal DNA Sequences. *PLoS One* 7: e46180.
- Marinho, M.A.T., Junqueira, A.C.M., Azeredo-Espin, A.M.L., 2011.** Evaluation of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) as a molecular marker for phylogenetic inference using

sequence and secondary structure information in blow flies (*Diptera: Calliphoridae*). *Genetica* 139, 1189-1207.

Martin, K.J., Rygiewicz, P.T., 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5.

Müller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J., Wolf, M., 2007. Distinguishing species. *RNA* 13, 1469-1472.

O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J.M., Vilgalys, R., 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5544-5550.

Paal, J., 1997. Eesti taimkatte kasvukohatüüpide klassifikatsioon. Tartu Ülikooli Botaanika ja Ökoloogia Instituut, Tallinn.

Petersen, H., Luxton, M., 1982. A comparative-analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39, 287-388.

Pinto, J.D., Koopmanschap, A.B., Platner, G.R., Stouthamer, R., 2002. The North American *Trichogramma* (*Hymenoptera: Trichogrammatidae*) parasitizing certain tortricidae (*Lepidoptera*) on apple and pear, with ITS2 DNA characterizations and description of a new species. *Biological Control* 23, 134-142.

Porco, D., Decaens, T., Deharveng, L., James, S.W., Skarzynski, D., Erseus, C., Butt, K.R., Richard, B., Hebert, P.D.N., 2013. Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biological Invasions* 15, 899-910.

Porco, D., Potapov, M., Bedos, A., Busmachi, G., Weiner, W.M., Hamra-Kroua, S., Deharveng, L., 2012. Cryptic diversity in the ubiquitous species *Parisotoma notabilis* (*Collembola, Isotomidae*): a long-used chimeric species? *PLoS One* 7: e46056.

Prasad, P.K., Tandon, V., Biswal, D.K., Goswami, L.M., Chatterjee, A., 2009. Use of sequence motifs as barcodes and secondary structures of internal transcribed spacer 2 (ITS2, rDNA) for identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae). *Bioinformatics* 3, 314-320.

Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364.

Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal* 4, 1340-1351.

Ruiz, E.A., Rinehart, J.E., Hayes, J.L., Zuniga, G., 2009. Effect of geographic isolation on genetic differentiation in *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera: Curculionidae). *Hereditas* 146, 79-92.

Sabais, A.C.W., Eisenhauer, N., Koenig, S., Renker, C., Buscot, F., Scheu, S., 2012. Soil organisms shape the competition between grassland plant species. *Oecologia* 170, 1021-1032.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.D., Bai, F.Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L., Cai, Q., Cardinali, G., Chaverri, P., Coppins, B.J., Crespo, A., Cubas P, P., Cummings, C., Damm, U., de Beer, Z.W., de Hoog, G.S., Del-Prado, R., Dentinger, B., Dieguez-Uribeondo, J., Divakar, P.K., Douglas, B., Duenas, M., Duong, T.A., Eberhardt, U., Edwards, J.E., Elshahed, M.S., Fliegerova, K., Furtado, M., Garcia, M.A., Ge, Z.W., Griffith, G.W., Griffiths, K., Groenewald, J.Z., Groenewald, M., Grube, M., Gryzenhout, M., Guo, L.D., Hagen, F., Hambleton, S., Hamelin, R.C., Hansen, K., Harrold, P., Heller, G., Herrera, G., Hirayama, K., Hirooka, Y., Ho, H.M., Hoffmann, K., Hofstetter, V., Hognabba, F., Hollingsworth, P.M., Hong, S.B., Hosaka, K., Houbraken, J., Hughes, K., Huhtinen, S., Hyde, K.D., James, T., Johnson, E.M., Johnson, J.E., Johnston, P.R., Jones, E.B., Kelly, L.J., Kirk, P.M., Knapp, D.G., Koljalg, U., Kovacs, G.M., Kurtzman, C.P., Landvik, S., Leavitt, S.D., Lliggenstoffer, A.S.,

Liimatainen, K., Lombard, L., Luangsa-Ard, J.J., Lumbsch, H.T., Maganti, H., Maharachchikumbura, S.S., Martin, M.P., May, T.W., McTaggart, A.R., Methven, A.S., Meyer, W., Moncalvo, J.M., Mongkolsamrit, S., Nagy, L.G., Nilsson, R.H., Niskanen, T., Nyilasi, I., Okada, G., Okane, I., Olariaga, I., Otte, J., Papp, T., Park, D., Petkovits, T., Pino-Bodas, R., Quaedvlieg, W., Raja, H.A., Redecker, D., Rintoul, T., Ruibal, C., Sarmiento-Ramirez, J.M., Schmitt, I., Schussler, A., Shearer, C., Sotome, K., Stefani, F.O., Stenroos, S., Stielow, B., Stockinger, H., Suetrong, S., Suh, S.O., Sung, G.H., Suzuki, M., Tanaka, K., Tedersoo, L., Telleria, M.T., Tretter, E., Untereiner, W.A., Urbina, H., Vagvolgyi, C., Vialle, A., Vu, T.D., Walther, G., Wang, Q.M., Wang, Y., Weir, B.S., Weiss, M., White, M.M., Xu, J., Yahr, R., Yang, Z.L., Yurkov, A., Zamora, J.C., Zhang, N., Zhuang, W.Y., Schindel, D., Fungal Barcoding, C., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6241-6246.

Schultz, J., Maisel, S., Gerlach, D., Muller, T., Wolf, M., 2005. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the *Eukaryota*. *RNA* 11, 361-364.

Seeber, J., Rief, A., Seeber, G.U.H., Meyer, E., Traugott, M., 2010. Molecular identification of detritivorous soil invertebrates from their faecal pellets. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1263-1267.

Siddiky, M.R.K., Kohler, J., Cosme, M., Rillig, M.C., 2012. Soil biota effects on soil structure: Interactions between arbuscular mycorrhizal fungal mycelium and *Collembola*. *Soil Biology and Biochemistry* 50, 33-39.

Smith, M.A., Bertrand, C., Crosby, K., Eveleigh, E.S., Fernandez-Triana, J., Fisher, B.L., Gibbs, J., Hajibabaei, M., Hallwachs, W., Hind, K., Hrcek, J., Huang, D.-W., Janda, M., Janzen, D.H., Li, Y., Miller, S.E., Packer, L., Quicke, D., Ratnasingham, S., Rodriguez, J., Rougerie, R., Shaw, M.R., Sheffield, C., Stahlhut, J.K., Steinke, D., Whitfield, J., Wood, M., Zhou, X., 2012. *Wolbachia* and DNA barcoding insects: patterns, potential, and problems. *Plos One* 7: e36514.

Song, Z., Wang, X., Liang, G., 2008. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Forensic Science International* 175, 17-22.

Stevens, M.I., Hogg, I.D., 2003. Long-term isolation and recent range expansion from glacial refugia revealed for the endemic springtail *Gomphiocephalus hodgsoni* from Victoria Land, Antarctica. *Molecular Ecology* 12, 2357-2369.

Tiunov, A.V., Scheu, S., 2005. Arbuscular mycorrhiza and *Collembola* interact in affecting community composition of saprotrophic microfungi. *Oecologia* 142, 636-642.

Tordoff, G.M., Boddy, L., Jones, T.H., 2008. Species-specific impacts of collembola grazing on fungal foraging ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 434-442.

Varga, J., Naar, Z., Dobolyi, C., 2002. Selective feeding of collembolan species *Tomocerus longicornis* (Mull.) and *Orchesella cincta* (L.) on moss inhabiting fungi. *Pedobiologia* 46, 526-538.

Wallwork, J.A., 1970. Ecology of soil animals. McGraw-Hill, London. [Viidatud raamatus Coleman *et al.*, 2004].

Wiemers, M., Keller, A., Wolf, M., 2009. ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (*Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatus*). *BMC Evolutionary Biology* 9: 300.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Raamatus: Innis MA, Gelfand DH. (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press: London, 315-322.

Wu, T., Ayres, E., Li, G., Bardgett, R.D., Wall, D.H., Garey, J.R., 2009. Molecular profiling of soil animal diversity in natural ecosystems: Incongruence of molecular and morphological results. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 849-857.

Yang, B., Cai, J., Cheng, X., 2011. Identification of astigmatid mites using ITS2 and COI regions. *Parasitology Research* 108, 497-503.

Yang, C., Ji, Y., Wang, X., Yang, C., Yu, D.W., 2013. Testing three pipelines for 18S rDNA-based metabarcoding of soil faunal diversity. *Science China-Life Sciences* 56, 73-81.

Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P., Chen, S., 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *Plos One* 5: e13102.

Young, I., Coleman, A.W., 2004. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30, 236-242.

Yu, D.W., Ji, Y., Emerson, B.C., Wang, X., Ye, C., Yang, C., Ding, Z., 2012. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 3, 613-623.

LISAD

Lisa 1. Proovialad

Proovialad	Koordinaadid	Kasvukohatüüp (Paal, 1997 järgi)
Endla	58° 52' 38,84"N; 26° 17' 17,64"E	Naadi
Nõo	58° 15' 45,12"N; 26° 32' 20,46"E	Jänesekapsa
Pivarootsi	58° 32' 47,76"N; 23° 35' 49,07"E	Saliinse rannikuniidu
Puhtu	58° 33' 20,77"N; 23° 33' 02,69"E	Naadi
Tartu	58° 21' 34,92"N; 26° 41' 08,58"E	Pargi
Triigi	59° 07' 22,74"N; 26° 19' 17,22"E	Sinilille
Tähtvere	58° 23' 31,83"N; 26° 40' 02,03"E	Mustika
Upa	58° 17' 19,68"N; 22° 33' 18,72"E	Kastikuloo/sinilille
Viidu1	58° 18' 01,08"N; 22° 05' 45,24"E	Jänesekapsa
Viidu2	58° 17' 55,32"N; 22° 06' 09,36"E	Angervaksa/sinilille
Viieristi	58° 00' 56,88"N; 22° 10' 30,36"E	Jänesekapsa/mustika
V-Maarja	59° 07' 50,51"N; 26° 15' 27,01"E	Köögiviljaaia

Lisa 2. Analüüsis kasutatud hooghännaliste liigid. Säilitus nr tähistab plutoF andmebaasis (<http://plutof.ut.ee> – Abarenkov *et al.*, 2010b) oleva isendi säilitusnumbrit ning ITS ja COI nr tähistavad UNITE andmebaasis (<http://unite.ut.ee> – Abarenkov *et al.*, 2010a) olevate isendite vastavate järjestuste registreerimisnumbreid.

Liik	Isendite arv	Leiukoht	Säilitus nr	ITS nr	COI nr
<i>Allacma fusca</i> (Linnaeus, 1758)	5	Tartu	TUZ031507	UDB016509	UDB018089
		Tartu	TUZ031565	UDB016566	UDB018139
		Nõo	TUZ031564	UDB016565	UDB018138
		Triigi	TUZ031526	UDB016527	UDB018109
		Upa	TUZ031540	UDB016541	UDB018121
<i>Anurophorus septentrionalis</i> (Palissa, 1966)	1	Tähtvere	TUZ031518	UDB016519	UDB018288
<i>Desoria</i> sp.	1	Viidu2	TUZ031571	UDB016572	UDB018145
<i>Dicyrtoma fusca</i> (Lubbock, 1873)	1	Tähtvere	TUZ031519	UDB016520	UDB018101
<i>Dicyrtomina minuta</i> (Fabricius, 1783)	2	Tähtvere	TUZ031563	UDB016564	UDB018137
		Tähtvere	TUZ031520	UDB016521	UDB018102
<i>Entomobrya nivalis</i> (Linnaeus, 1758)	2	V-Maarja	TUZ031524	UDB016525	UDB018107
		V-Maarja	TUZ031525	UDB016526	UDB018108
<i>Entomobrya</i> sp.	1	Tähtvere	TUZ031598	UDB018290	UDB018289
<i>Entomobryidae</i>	1	Puhtu	TUZ031544	UDB016545	UDB018125
<i>Folsomia fimetaria</i> (Linnaeus, 1758)	1	Puhtu	TUZ031534	UDB016535	UDB018116
<i>Folsomia quadrioculata</i> (Tullberg, 1871)	2	Puhtu	TUZ031533	UDB016534	UDB018115
		Upa	TUZ031541	UDB016542	UDB018122
<i>Folsomia</i> sp.	3	Endla	TUZ031528	UDB016529	UDB018112
		Endla	TUZ031530	UDB016531	UDB018113
		Upa	TUZ031542	UDB016543	UDB018123
<i>Hypogastrura</i> sp.	2	Nõo	TUZ031581	UDB018180	UDB018166
		Nõo	TUZ031582	UDB018181	UDB018167
<i>Isotoma riparia</i> (Nicolet, 1842)	1	Pivarootsi	TUZ031589	UDB018284	UDB018174
<i>Isotoma viridis</i> (Bourlet, 1839)	6	Tartu	TUZ031508	UDB016508	UDB018090
		Tartu	TUZ031509	UDB016510	UDB018091
		Nõo	TUZ031511	UDB016512	UDB018093
		Nõo	TUZ031512	UDB016513	UDB018094
		Tähtvere	TUZ031560	UDB016561	UDB018134
		Viidu2	TUZ031594	UDB018285	UDB018178

<i>Isotomiella minor</i> (Schaeffer, 1896)	2	Endla	TUZ031531	UDB016532	UDB018114
		Viidu2	TUZ031559	UDB016560	UDB018133
<i>Lepidocyrtus cyaneus</i> (Tullberg, 1871)	1	V-Maarja	TUZ031583	UDB018282	UDB018168
<i>Lepidocyrtus lignorum</i> (Fabricius, 1775)	6	Tartu	TUZ031504	UDB016505	UDB018086
		Nõo	TUZ031580	UDB018283	UDB018165
		Nõo	TUZ031558	UDB016559	UDB018132
		Endla	TUZ031562	UDB016563	UDB018136
		Upa	TUZ031570	UDB016571	UDB018144
		Upa	TUZ031549	UDB016550	UDB018151
<i>Lipothrix lubbocki</i> (Tullberg, 1872)	1	Upa	TUZ031539	UDB016540	UDB018120
<i>Megalothorax minimus</i> (Willem, 1900)	2	Tähtvere	TUZ031587	UDB018183	UDB018172
		Tähtvere	TUZ031523	UDB016524	UDB018106
<i>Neanura muscorum</i> (Templeton, 1835)	1	Tähtvere	TUZ031521	UDB016522	UDB018103
<i>Onychiuridae</i>	1	Upa	TUZ031569	UDB016570	UDB018143
<i>Orchesella bifasciata</i> (Bourlet, 1839)	2	Nõo	TUZ031513	UDB016514	UDB018095
		Tartu	TUZ031556	UDB016557	UDB018130
<i>Orchesella cincta</i> (Linnaeus, 1758)	1	Tartu	TUZ031505	UDB016506	UDB018087
<i>Orchesella flavescens</i> (Bourlet, 1839)	1	Tähtvere	TUZ031515	UDB016516	UDB018098
<i>Parisotoma notabilis</i> (Schaeffer, 1896)	3	Nõo	TUZ031510	UDB016511	UDB018092
		Puhtu	TUZ031535	UDB016536	UDB018117
		Upa	TUZ031537	UDB016538	UDB018118
<i>Pogonognathellus flavescens</i> (Tullberg, 1871)	1	Tähtvere	TUZ031527	UDB016528	UDB018110
		Tartu	TUZ031500	UDB016501	UDB018081
		Tartu	TUZ031501	UDB016502	UDB018083
		Tartu	TUZ031502	UDB016503	UDB018084
		Tartu	TUZ031503	UDB016504	UDB018085
		Tartu	TUZ031506	UDB016507	UDB018088
		Tartu	TUZ031566	UDB016567	UDB018140
<i>Pseudachorutes dubius</i> (Krausbauer, 1898)	1	Viidu1	TUZ031546	UDB016547	UDB018126
<i>Sminthurides</i> sp.	3	Tartu	TUZ031561	UDB016562	UDB018135
		Nõo	TUZ031567	UDB016568	UDB018141
		Nõo	TUZ031568	UDB016569	UDB018142
<i>Sminthurinus</i> sp.	2	Viidu2	TUZ031572	UDB017813	UDB018147
		Viidu2	TUZ031573	UDB016573	UDB018148

<i>Tomocerus</i> sp.	4	Tähtvere	TUZ031517	UDB016518	UDB018100
		Tähtvere	TUZ031516	UDB016517	UDB018099
		Tähtvere	TUZ031514	UDB016515	UDB018097
		Tähtvere	TUZ031586	UDB018182	UDB018171
<i>Xenylla humicola</i> (Fabricius, 1780)	1	Pivarootsi	TUZ031538	UDB016539	UDB018119
<i>Xenylla</i> sp.	1	Tartu	TUZ031553	UDB016554	UDB018128
<i>Xenylla tullbergi</i> (Börner, 1903)	1	Upa	TUZ031590	UDB018184	UDB018291

Lisa 3. Käesoleva töö käigus Eestist esmakordselt registreeritud hooghännaliste liigid. Säilitus nr tähistab plutoF andmebaasis (<http://plutof.ut.ee> – Abarenkov *et al.*, 2010b) oleva isendi säilitusnumbrit ning ITS ja COI nr tähistavad UNITE andmebaasis (<http://unite.ut.ee> – Abarenkov *et al.*, 2010a) olevate isendite vastavate järjestuste registreerimisnumbreid.

Liik	Leiukoht	Säilitus nr	ITS nr	COI nr
<i>Anurophorus septentrionalis</i> (Palissa, 1966)	Tähtvere	TUZ031518	UDB016519	UDB018288
<i>Dicyrtoma fusca</i> (Lubbock, 1873)	Tähtvere	TUZ031519	UDB016520	UDB018101
<i>Dicyrtomina minuta</i> (Fabricius, 1783)	Tähtvere	TUZ031563	UDB016564	UDB018137
	Tähtvere	TUZ031520	UDB016521	UDB018102
<i>Entomobrya corticalis</i> (Nicolet, 1842)	Viidu1	TUZ031597	-	UDB018287
<i>Entomobrya marginata</i> (Tullberg, 1871)	Upa	TUZ031544	UDB016545	UDB018125
<i>Hypogastrura socialis</i> (Uzel, 1890)	Elva	TUZ031595	-	UDB018179
	Tartu	TUZ031504	UDB016505	UDB018086
<i>Lepidocyrtus lignorum</i> (Fabricius, 1775)	Nõo	TUZ031580	UDB018283	UDB018165
	Nõo	TUZ031558	UDB016559	UDB018132
	Endla	TUZ031562	UDB016563	UDB018136
	Upa	TUZ031570	UDB016571	UDB018144
	Upa	TUZ031549	UDB016550	UDB018151
<i>Lipothrix lubbocki</i> (Tullberg, 1872)	Upa	TUZ031539	UDB016540	UDB018120
<i>Pseudachorutes dubius</i> (Krausbauer, 1898)	Viidu2	TUZ031546	UDB016547	UDB018126

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sten Anslan (sünnikuupäev: 25.03.1987),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „ITS regiooni kasutatavus hooghännaliste (Collembola) määramisel“, mille juhendaja on Leho Tedersoo,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace´i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013