

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Ökoloogia ja maateaduste instituut
Botaanika osakond

Mihkel Suija

**Varakult lahknenud seenerühma *Basal clone group 2*
visualiseerimine CARD-FISH meetodikaga**

Bakalaureusetöö

Bioloogia ja elustiku kaitse

12 EAP

Juhendaja PhD Leho Tedersoo (Tartu Ülikool)

Tartu 2021

Infoleht

Varakult lahkenud seenerühma *Basal clone group 2* visualiseerimine CARD-FISH meetodikaga

Bakalaureusetöö teoreetilise osa eesmärk oli anda ülevaade varakult lahkenud seente taksonitest, nende ökoloogilisest rollist ja nende uurimiseks kasutatavatest meetoditest. Töö eksperimentaalse osa eesmärk oli välja töötada varasemate uurimistööde alusel CARD-FISH protokoll, mis võimaldaks edaspidiselt uurida mikroskoopilisi seeni. Töö uurimisobjektiks oli ainult keskkonnast pärit geenijärjestuste põhjal teadaolev rühm laborinimega *Basal clone group 2* (BCG2).

Märksõnad: varakult lahkenud seened, BCG2, CARD-FISH

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Visualization of an early diverging fungal lineage *Basal clone group 2* using the CARD-FISH method

The theoretical part of this bachelor thesis gives an overview of the early diverging fungal taxa, their ecological role and the methods used to study them. The aim of the experimental part of the thesis was to develop a CARD-FISH protocol based on previous protocols that allows to study microscopic fungi. The object of the study was a group only known from environmental DNA sequences with a lab name *Basal clone group 2* (BCG2).

Keywords: early diverging fungi, BCG2, CARD-FISH

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Teoreetiline osa.....	6
1.1. <i>Holomycota</i> ja <i>Nucleariae</i>	6
1.2. Seente käsitus.....	6
1.2.1. <i>Rozella</i>	7
1.2.2. Mikrosporiidid.....	9
1.2.3. <i>Basal clone group 1</i>	10
1.2.4. <i>Aphelidiomycota</i>	11
1.2.5. <i>Basal clone group 2</i>	13
1.3. Varakult lahkenud seente roll veeökosüsteemides	13
1.4. Metatriipkoodistamine	14
1.5. FISH ja CARD-FISH.....	14
2. Praktiline osa	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. DNA eraldamine, amplifitseerimine ja sekveneerimine.....	16
2.3. CARD-FISH oligonukleotiidi disain	17
2.4. Mullaproovide fikseerimine ja filtrile kandmine	18
2.5. Mageveeproovide fikseerimine ja filtrile kandmine	19
2.6. <i>In situ</i> fluorestentshübridisatsioon	19
2.7. Mikroskopeerimine	20
3. Tulemused	21
3.1. CARD-FISH	21
3.1.1. Oligonukleotiidi spetsiifilisus <i>in silico</i>	21
3.1.2. Annelinna mullaproov	21
3.1.3. Emajõe veeproovid.....	22
3.1.4. Kontrollproovid.....	23
3.2. Metatriipkoodistamise tulemused	26
4. Arutelu	27
Kokkuvõte	29
Kasutatud kirjandus	32
Lisad	40
Lisa 1. Kasutatud praimerid	40
Lisa 2. Konfokaalmikroskoobi pildid võimalikust rakusisesest interaktsioonist.....	41

Mõisted

Alexa fluor 488 – fluorestseeruv värvaine, mille emissioon on suurim nähtava valguse rohelises spektrialas

Calcofluor-White – kitiini ja tselluloosiga seonduv fluorestseeruv värvaine

CARD-FISH – ingl *catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization*; ka TSA-FISH

DAPI – 4',6-diamino-2-fenüülindool, DNA AT-rikka piirkonnaga seonduv fluorestseeruv värvaine

FISH – *in situ* fluorestentshübridisatsioon (ingl *in situ fluorescence hybridization*)

ITS – sisemine transkribeeritav speisser, regioon tuuma rRNA 18S ja 28S rRNA geeniregioonide vahel

rRNA – ribosomaalne RNA, mis jaguneb eukarüootidel omakorda 18S, ITS1, ITS2, 5.8S ja 28S regioonideks

Sissejuhatus

Seened on üks mitmekesisemaid eukarüootide rühmi, kelle erinevad liigid võivad käituda nii lagundajate, mutualistide kui ka patogeenidena. Traditsiooniliselt on seente eristamine toimunud kas viljakehade või eluskultuuride morfoloogia alusel, mis on võimaldanud tänapäevaks kirjeldada veidi üle 148 000 seeneliigi (Cheek *et al.*, 2020). Samas hinnatakse seente tegelikuks liikide arvuks 2,2–3,8 miljonit (Hawksworth ja Lücking, 2017). Eriti vähe on teada kõige varem lahknunud seentest hõimkondadest *Rozellomycota* ja *Aphelidiomycota*, kelle senikirjeldatud liigid on kõik obligatoorsed endoparasiidid ja erinevalt kõigist teistest seentest fagotroofse toitumisega. Nende isendite kirjeldamise on teinud keeruliseks ka fülogeneetilisel kaugete taksonite sarnane eluviis ja morfoloogia, mistõttu on nende leidmine ja omavahel eristamine keskkonnast keeruline (Naranjo-Ortiz ja Gabaldón, 2019).

Viimase paarikümne aasta jooksul on uute taksonite määramisel toimunud suur läbimurre, sest kasutusele on tulnud suure läbilaskevõimega (ingl *high throughput sequencing* ehk HTS) DNA sekveneerimismeetodid (Tedersoo *et al.*, 2017). Nii on leitud, et varakult lahknunud seened esinevad peaaegu kõikides maismaa- ja veeökosüsteemides ning et nende liikide arv võib olla võrreldav kõigi ülejäänud seente liikide arvuga (Jones *et al.*, 2011). Vaatamata DNA järjestuste olemasolule puudub siiani arusaam varakult lahknunud rühmade eluviisidest ja morfoloogiast, mis on oluliselt pidurdanud uute taksonite kirjeldamist (Lücking *et al.*, 2021).

Käesoleva töö esimeses osas antakse ülevaade enamusest seni kirjeldatud *Holomycota* varakult lahknunud taksonite morfoloogiast, eluviisist ja fülogeneesist. Lisaks kirjeldatakse lühidalt metatriipkoodistamist ja kahte *in situ* fluorestsentshübridisatsiooni meetodit. Töö eksperimentaalses osas katsetati CARD-FISH meetodit, mida on varasemalt kasutatud edukalt varakult lahknunud seente visualiseerimiseks. Töö käigus kohandati varasemate uurimistöde alusel laboriprotokoll, mis võimaldaks Tartu Ülikooli mükoloogia labori võimalusi arvestades visualiseerida erinevatest keskkonnaproovidest leitavaid taksonid. Uurimisobjektiks võeti senimaani ainult keskkonna geenijärjestuste põhjal teadaolev varakult lahknunud seenerühm *Basal clone group 2* ehk BCG2, mis erinevate fülogeneesianalüüside järgi võib olla seente kõige varem lahknunud rühmaga (Arroyo *et al.*, 2018; Tedersoo *et al.*, 2017). Rühma isendite kirjeldamine annaks olulist informatsiooni seente evolutsioonist ja varakult lahknunud seente eluviisilisest mitmekesisusest. Töö käigus viidi proovidega läbi ka metatriipkoodistamise uuring, tuvastamaks proovidest BCG2 rühmale kuuluvaid geenijärjestusi.

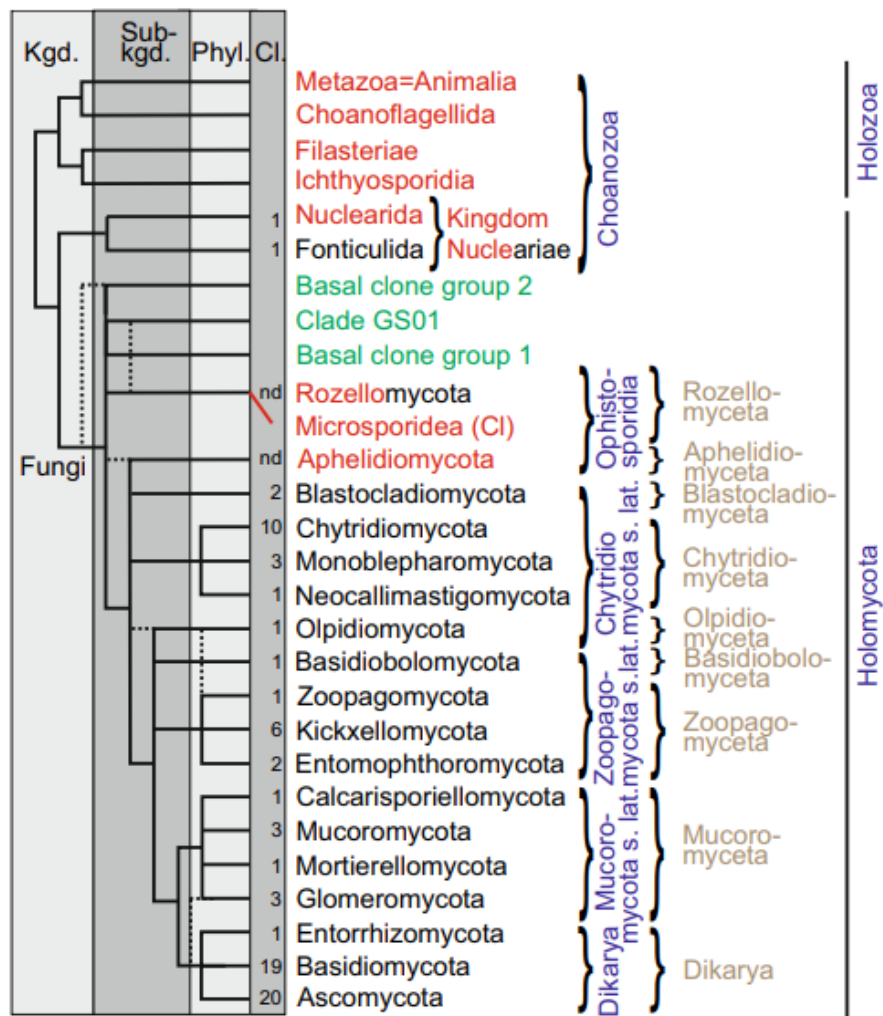
Teoreetiline osa

1.1. *Holomycota* ja *Nucleariae*

Riik seened (*Fungi*) ja riik *Nucleariae* (ka *Cristidiscoidea*) kuuluvad *Holomycota* ülemriiki, mis moodustab koos *Holozoa* ülemriigiga tagavibursete ehk *Opisthokonta* rühma (Cavalier-Smith, 1998; Tedersoo *et al.*, 2018a). Kõige esimesena lahknes *Holomycota* harus riik *Nucleariae*, kuhu kuulub Galindo *et al.* (2019) järgi viis perekonda: *Nuclearia*, *Parvularia*, *Fonticula*, *Pompholyxophrys* ja *Lithocolla*. Kõik nad on filoosete pseudopoodidega amööbid, kes on evolutsiooni käigus kaotanud tagavibursetele omase viburi (Galindo *et al.*, 2019). *Fonticula* perekonna ainus kirjeldatud liik *Fonticula alba* võib lisaks moodustada hulkrakse koonusekujulise viljakeha (Worley *et al.*, 1979) ja perekondade *Pompholyxophrys* ning *Lithocolla* liigid moodustavad enda ümber ränimineraalidest koosneva kesta (Galindo *et al.*, 2019). Perekondasid on kirjeldatud nii vee- kui ka maismaa ökosüsteemidest, kuid metatriipkoodistamise andmetel võib nende suurim liigirikkus olla mageveekogudes (Galindo *et al.*, 2019).

1.2. Seente käsitlus

Tänapäevaste teadmiste põhjal lahknesid seened umbes miljard aastat tagasi, kui elu maismaal ei olnud veel suuresti välja kujunenud (Berbee *et al.*, 2017). Seente riigi piiritlemine ja maht on aja jooksul muutunud. Enne molekulaarsete meetodite kasutuselevõttu eristati seente hulgas munasseeni (*Oomycota*), limasseeni (*Myxomycetes*), viburseeni (*Chytridiomycota*), ikkesseeni (*Zygomycota*), kandseeni (*Basidiomycota*) ja kottseeni (*Ascomycota*) (Whittaker, 1969). Järgnevate DNA põhiste fülogeneesianalüüside käigus selgus, et ikkesseente ja viburseente hõimkonnad on parafüleetilised ning munasseened ja limaseened kuuluvad vastavalt stramenopiilide (*Stramenopila*) ja amööbide (*Amoebozoa*) hulka (Naranjo-Ortiz ja Gabaldón, 2019). Lisaks leiti, et varem viburseente seltsi *Spizellomycetales* paigutatud perekond *Rozella* lahkneb enne kõiki teisi seeni ja moodustab koos teiste keskkonnast eraldatud rRNA geenijärjestustega kõigi ülejäänud seente sõsarrühma *Rozellomycota* (ka *Cryptomycota* või *Rozellida*) (Jones *et al.*, 2011). Karpov *et al.* (2013) näitasid, et *Rozellomycota* hõimkonnaga on suguluses ka hõimkond *Aphelidiomycota*. Hiljem näitasid Tedersoo *et al.* (2017), et varasematest metatriipkoodistamise uuringutest teadaolevad taksonid laborinimedega GS01 ja BCG2 lahknevad enne *Rozellomycota* hõimkonda ja võivad moodustada kõigi ülejäänud seente sõsarrühma (joonis 1). Varakult lahkenud seened on eluviisilt üsna sarnased (enamus on fagotroopsed endoparasiidid), kuid on morfoloogiliselt ja kohastumuslikult varieeruvad.

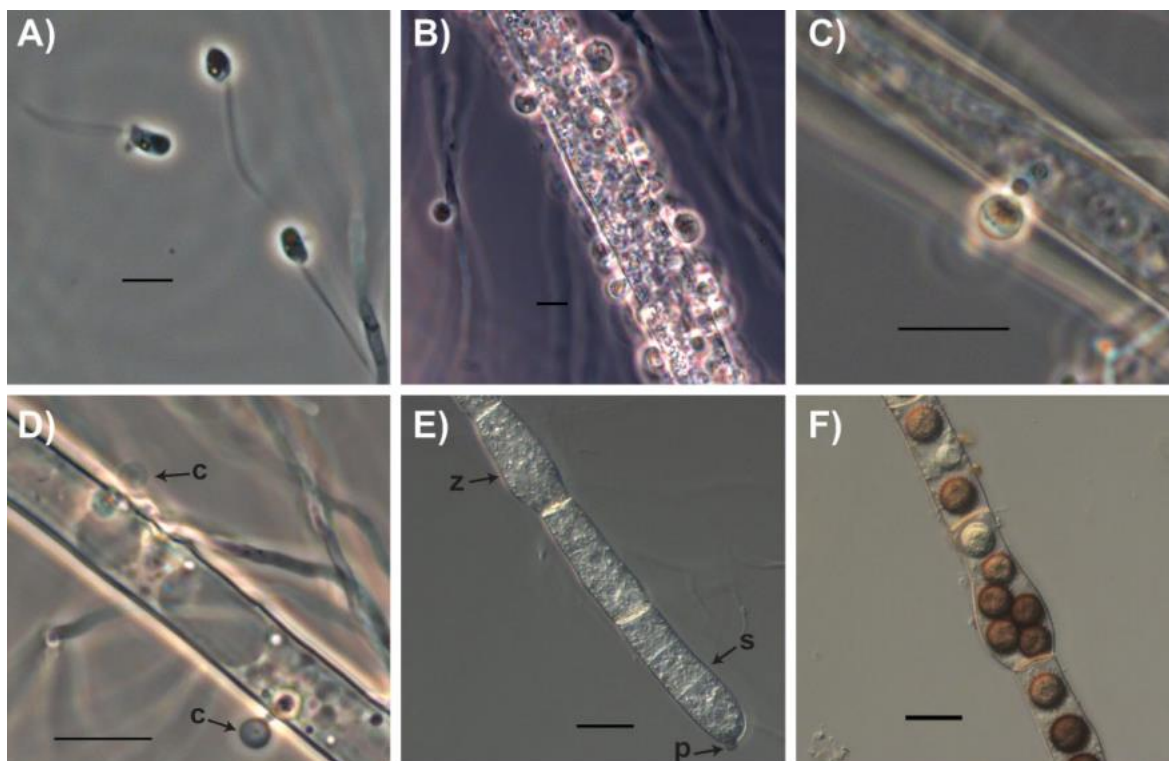


Joonis 1. Seente (*Fungi*) hõimkonnad Tedersoo *et al.* (2018a) järgi. Punasega on märgitud taksonid, mida on varasemalt klassifitseeritud lähtuvalt zooloogilisest nomenklatuurist; rohelisega on märgitud suuremad taksonid, mille ühtegi liiki pole senimaani veel kirjeldatud; pruuniga on märgitud taksonid, mis piiritlevad alamriike; sinisega on märgitud taksonid varasema klassifikatsiooni järgi. Numbrid hõimkondade taga näitavad hõimkonnas olevate klasside arvu. Joonis on võetud tööst Tedersoo *et al.* (2018a).

1.2.1. Rozella

Perekonnas *Rozella* (*Rozellomycota*) on kirjeldatud 27 liiki, kes kõik on rakusisesed parasiidid. Nende peremehed võivad olla näiteks munasseened (*Oomycota*, *Stramenopila*) ja jõnksviburseened (*Blastocladiomycota*) (Letcher ja Powell, 2018). Perekonnast *Rozella* on uuritud kõige rohkem liiki *Rozella allomycetis*, millel põhineb ka perekonna elutsükli kirjeldus. Peremehe (jõnksviburseen *Allomyces arbusculus*) nakatamine toimub viburiga rändeostega (zoosporidega), mis peremehe leidmisel entsüsteeruvad (joonis 2 A, B; James

ja Berbee, 2012). Peale entsüsteerumist kasvab tsüstist välja kitiinist nakatamistoru, millega parasiit läbib peremehe rakukesta (James *et al.*, 2013). Nakatamistoru kaudu siseneb parasiidi protoplast peremehe rakku, mille jaoks vajaliku rõhu tekitab spoori tagaosas veega täituv vakuool (joonis 2, C, D). Peremehes muutub protoplast rakukestata hulgituumseks sporangiaalseks plasmoodiumiks, mis arvatavasti toitub fagotroofselt peremehe tsütoplasmast (Powell, 1984; Powell ja Letcher, 2019). Ultrasturktuuriuuringud näitavad, et peremehe mitokondrid koonduvad infektsiooni ajal parasiidi plasmoodiumi ümber (Powell ja Letcher, 2019). Kuna varasemalt on teada, et *Rozella allomycetis* on horisontaalse geeniülekanega omandanud nukleotiidi transporterite geenid, siis arvatavasti viitab see ATP „varastamisele“ peremehelt (James *et al.*, 2013). Kui parasiidi plasmoodium on täitnud kogu peremehe raku, siis tekivad sellest kitiinist rakukestaga zoosporangiumid, milles moodustuvad uued zoosporid. *Rozella allomycetis* puhul on zoosporangiumid omavahel eraldatud ka vaheseintega (joonis 2, E). Nii vaheseinu kui ka rakukesti indutseerib parasiit peremehel ise tekitama. Lõpuks väljuvad zoosporid peremehest, kasutades selleks moodustunud poori kaudu. Parasiit võib moodustada ka ebasobivate elutingimuste üleelamiseks kitiinist rakukestaga puhkeoseid (Letcher ja Powell, 2018; joonis 2, F).



Joonis 2. *Rozella allomycetis* elutsükkel. **A** *R. allomycetis* zoosporid; **B** zoosporide kinnitumine jõnksviburseene *Allomyces arbusculus* hüüfile; **C** *Allomyces arbusculus* rakukesta läbistamine ja *R. allomycetis* protoplasti sisenemine hüüfi; **D** *R. allomycetis* tühjad

tsüstid nakatamistoruga (c); **E** *R. allomycetis* zoosporangiumid (z), neid eraldavad vaheseinad (s) ja zoosporide väljumiseks moodustunud poor (p); **F** *R. allomycetis* puhkeosed *A. arcbusculus* hüüfis. Mõõtskaala A, B = 5 µm; C, D = 10 µm; E, F = 20 µm. Joonis on võetud tööst James ja Berbee (2012).

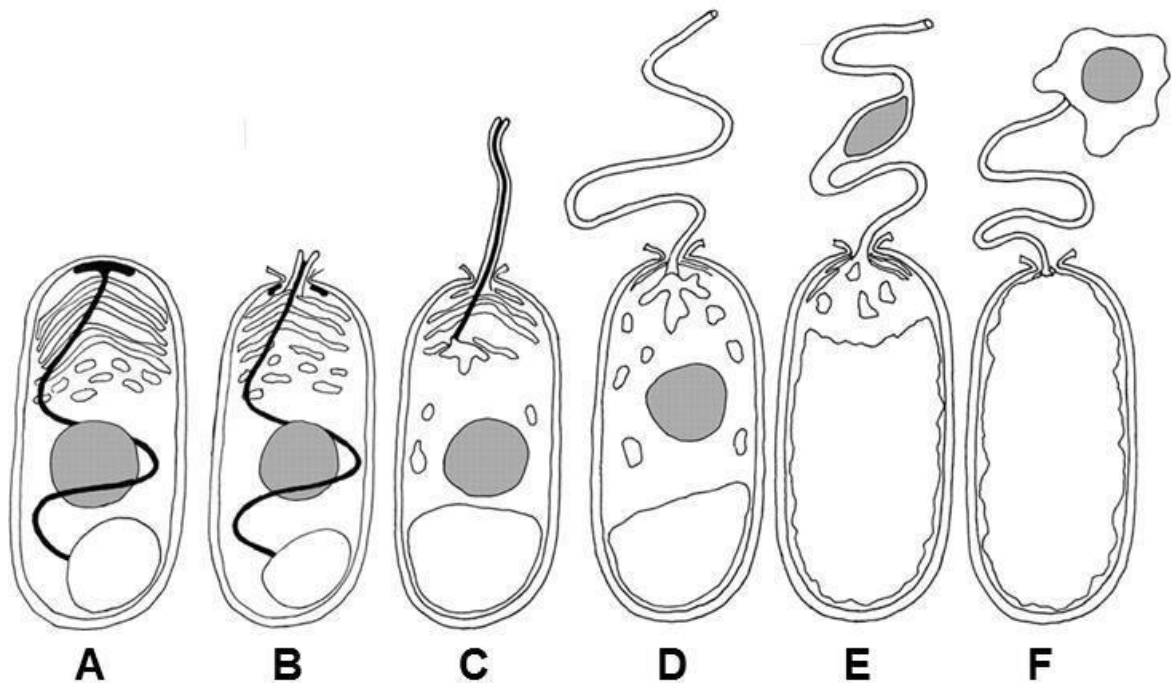
1.2.2. Mikrosporiidid

Mikrosporiidid ehk pisieoselised (erinevates käsitlustes omaette hõimkond *Microsporidia* või klass *Microsporidea* hõimkonnas *Rozellomycota*) on umbes 1400 liigist koosnev rühm, mis on tuntud peamiselt loomade endoparasiitidena (Karpov *et al.*, 2014; Tedersoo *et al.*, 2018a). Mikrosporiidide spoorid on viburita ja kaetud välimise valgulise (eksospor) ning sisemise kitiinist (endospor) rakukestaga. Lisaks iseloomustab rühma spetsiifiline ümber rakutuuma keerdunud ja seest õõnes nakatamisorgan polaarfiliament (Han *et al.*, 2020). Mikrosporiidide elutsükkel algab polaarfiliamenti vallandumisega, millega parasiit läbib peremehe rakumembraani (joonis 3). Filiamenti vallandumiseks vajaliku rõhu tekitab spoori tagaosas veega täituv vakuool (joonis 3, C–F). Vakuooli täitumine surub parasiidi protoplasti (sporoplasma) polaarfiliamenti kaudu peremehe rakku (joonis 3, E ja F). Peremehes võib erinevate mikrosporiidi liikide elutsükkel varieeruda, kuid lõpptulemusena moodustuvad peremehes kas uued polaarfiliamentiga spoorid, puhkeosed või mõlemad (Keeling ja Fast, 2002). Erinevalt perekonnast *Rozella* pole mikrosporiididel peremehe tsütoplasma fagotsütoosi täheldatud (Bass *et al.*, 2018).

Tulenevalt parasiitsetest eluviisist iseloomustab mikrosporiide funktsionaalse genoomi vähenemine, mistõttu on nad ühe väikseima genoomiga eukarüoodid. Lisaks on mikrosporiidide mitokondrid taandarenenud mitosoomiks, millel puudub mitokondriaalne DNA (mtDNA) ja oksüdatiivse fosforüülimise võime (Williams *et al.*, 2002). Mitokondri puudumise tõttu on mikrosporiide peetud ka algelisteks eukarüootideks (Cavalier-Smith, 1987). α - ja β tubuliini kodeerivate geenide analüüs paigutas mikrosporiidid aga seente üheks varakult lahknenuks rühmaks (Keeling ja Fast, 2002). Hilisem võrdlev genoomianalüüs näitas, et nii *Rozella* kui ka mikrosporiidid omavad mitmeid samu gene (sh müosiini domeeniga kitiini süntaaside ja nukleotiidi transporterite geenid). Seetõttu arvatakse, et mikrosporiididel ja perekonnal *Rozella* oli ühine rakusisese eluviisiga eellane (James *et al.*, 2013).

Mikrosporiidide ja *Rozella* sugulust kinnitavad ka fülogeneetiliselt lähedaste ja morfoloogiliselt vahepealsete tunnustega rühmade avastamine. Esmalt näidati

mikrosporiididega lähemalt suguluses olevatel taksonitel laborinimetustega LKM11 ja CM1.1 viburiga spooride ja tsüstistaadiumi olemasolu (Jones *et al.*, 2011). Järgnevad fülogeneesianalüüsid näitasid veel kolme varem kirjeldatud perekonna kuulumist *Rozellomycota* hõimkonda: *Nucleophaga* (Corsaro *et al.*, 2014a), *Paramicrosporidium* (Corsaro *et al.*, 2014b) ja *Mitosporidium* (Haag *et al.*, 2014). Kolme perekonna senikirjeldatud liikide spoorid on kahe rakukestaga, ilma viburita ning polaarfilamendiga, kuigi perekondadel *Nucleophaga* ja *Paramicrosporidium* on polaarfilamendi morfoloogia mikrosporiidest erinev (Bass *et al.*, 2018). Kahe perekonna (*Nucleophaga* ja *Mitosporidium*) ultrastruktuuriuuringud on näidanud peremehe tsütoplasma fagotsütoosi (Corsaro *et al.*, 2014a; Haag *et al.*, 2014).

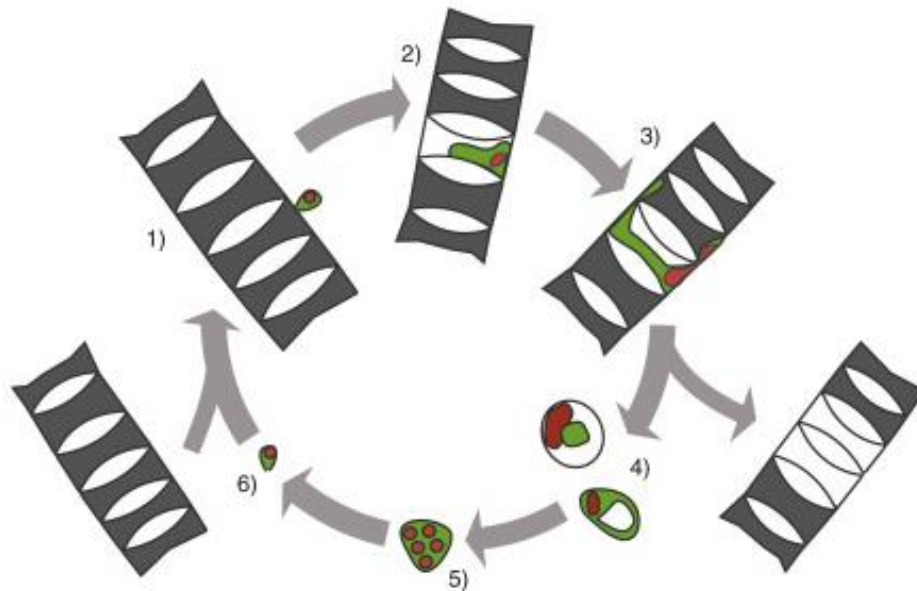


Joonis 2. Mikrosporiidi polaarniidi vallandumine ja protoplasti sisenemine peremehe raku. **A** „idanemata“ spoor, näha on polaarfilament (must), rakutuum (hall) ja posterioorne vakuool (valge); **B, C, D** polaarfilamendi vallandumine ja posterioorse vakuooli veega täitumine; **E, F**, parasiidi protoplasti sisenemine peremehe raku. Joonis on võetud tööst Keeling ja Fast (2002).

1.2.3. Basal clone group 1

Basal clone group 1 (BCG1; Nagahama *et al.*, 2011) ehk *novel chytrid like clade 1* (NCL1; Richards *et al.*, 2015) on arvatavasti kas *Rozellomycota* kõige varem lahknenu rühm või selle sõsarrühm (Chambouvet *et al.*, 2019). Rühma rRNA geenijärjestusi on leitud nii

setetest (Nagahama *et al.*, 2011), merealuste vulkaanide juurest (Calvez *et al.*, 2009) kui ka mereveeproovide erineva poorisuurusega filtrite fraktsioonidest, mis viitab rühma erineva suuruse ja morfoloogiaga elufaasidele (Richards *et al.*, 2015). Rühma lai levik erinevates mere ökosüsteemides võib näidata, et varakult lahknenud seente roll neis võib olla seni arvatust suurem (Richards *et al.*, 2015). Chambouvet *et al.* (2019) kirjeldas rühma võimaliku elutsükli, kasutades selleks CARD-FISH meetodit (pt 1.5). Nad leidsid, et tegemist on levinuimate mereliste ränivetikate perekondade (*Chaetoceros*, *Leptocylindrus*, jt) endoparasiitidega. Põhiplaanis sarnaneb nende elutsükkel perekond *Rozella* omale, koosnedes samuti spoori, tsüsti ja endoparasiitset fagotroofsest staadiumist (joonis 4, 1–3). Lisaks võib neil toimuda kas peremehe vahetus või neil esineb tundmatu funktsiooniga sekundaarne tsüstistaadium (joonis 4, 4). Samuti esineb neil peremeheväline hulgituumne staadium, mida autorid peavad parasiidi sporangiumiks (joonis 4, 5).



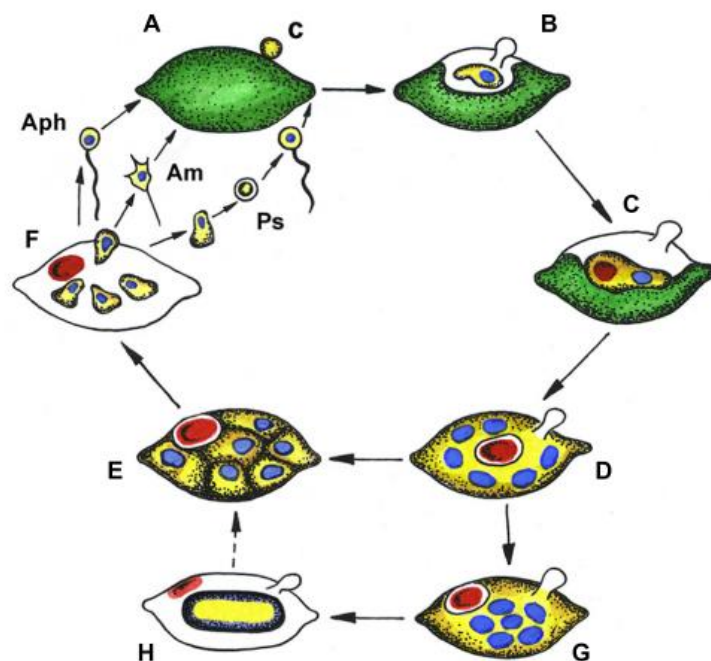
Joonis 4. BCG1 oletatav elutsükkel. **1)** Parasiidi spoori kinnitumine ränivetikale; **2)** ja **3)** ränivetika tsütoplasma fagotsütoos; **4)** peremehe vahetus või sekundaarne tsüstistaadium **5)** peremeheväline hulgituumne staadium **6)** uute spooride moodustamine. Joonis on võetud tööst Chambouvet *et al.* (2019).

1.2.4. *Aphelidiomycota*

Aphelidiomycota (ka *Aphelidea*) on vee-eluline endoparasiitide hõimkond, kuhu kuuluvad taksonid võivad nakatada rohe-, räni- ja eriviburvetikaid (Tedersoo *et al.*, 2018a). Hõimkonnas on kirjeldatud neli perekonda (*Aphelidium*, *Amoeboaphelidium*, *Paraphelidium* ja *Pseudaphelidium*), kelle omavaheline eristamine toimub peamiselt

zoosporide tunnuste alusel. Need võivad olla ühe posterioorse viburiga ja peremehele kinnitumisel filoossete (*Aphelidium*) või loboossete (*Paraphelidium*) pseudopoodidega, ilma viburita (või mittefunktsionaalse viburiga) ning pseudopoodidega (*Amoeboaphelidium*) või algselt amöboidsed ja peale kestumist viburiga (*Pseudaphelidium*) (joonis 5; Karpov *et al.*, 2014).

Algsed rRNA geeniandmete analüüsid klasterdasid *Aphelidiomycota* kokku *Rozellomycota* ja *Microsporidia* rühmaga (Letcher *et al.*, 2013). Kuna *Aphelidiomycota* elutsükkel sarnaneb *Rozella* omaga (joonis 5), siis loodi kõiki kolme rühma ühendav rühm *Opisthosporidia*, mida ekslikult peeti monofüleetiliseks (Karpov *et al.*, 2014). Hilisemad suurema andmemahuga rRNA geeniuringud paigutasid aga *Aphelidiomycota* kokku ülejäänud seentega, näidates et *Opisthosporidia* on parafüleetiline (Tedersoo *et al.*, 2018a). Samuti viitab rühma eristumisele *Aphelidiomycota* liigi *Paraphelidium tribonemae* metabolismi sarnasus viburseente ja jõnksviburseentega. Tulenevalt *Opisthosporidia* parafüleetilisusest oletatakse, et seente eellasel pidi lisaks liikumisvõimelisele viburiga staadiumile olema ka fagotroofne rakusisene elustaadium (Torruella *et al.*, 2018). Samas ei ole välistatud ka võimalus, et osmotroofsus oli kujunenud välja juba seente eellasel ning kitiinkesta kadumine *Rozellomycota* ja *Aphelidiomycota* troofilises staadiumis oli kohastumus endoparasiitseks fagotroofseks eluviisiks (Berbee *et al.*, 2017). Seega on paljuski seente varajane evolutsioon siiani selgusetu ja selle lahtimõtestamiseks on vaja uurida täiendavalt erinevaid varakult lahknenuid seenerühmi.



Joonis 5. *Aphelidiomycota* elutsükli joonis. **A** ja **B** Parasiidi spoori kinnitumine peremehe rakule, selle entsüsteerumine (c) ja parasiidi protoplasti sisenemine peremehe rakku; **B**, **C** peremehe tsütoplasma fagotsütoos, punasega on näidatud parasiidi jääkkehja; **D** parasiidi protoplasti tuumade jagunemine ja zoosporideks diferentseerumine; **F** zoosporide väljumine; **G** ja **E** parasiidi puhkeose moodustumine. Aph on perekond *Aphelidium* zoosporid, Am perekond *Amoebaphelidium* zoosporid ja Ps perekond *Pseudaphelidium* (erinevad) zoosporid. Joonis on võetud tööst Karpov *et al.* (2014).

1.2.5. Basal clone group 2

Basal clone group 2 (BCG2; Tedersoo *et al.*, 2018a) ehk *freshwater holomycota* (FRESHOL1; Arroyo *et al.*, 2018) rRNA geenijärjestusi leiti esmalt pürosekvenerimisega Prantsusmaalt Pavini järvest, kus need paigutusid fülogeneesianalüüsis ripsloomade (*Ciliophora*) hõimkonda (Monchy *et al.*, 2011). Tedersoo *et al.* (2017) näitas aga, et BCG2 moodustab koos teise ainult metatriipkoodistamisest tuntud taksoniga GS01 kõigi ülejäänud seente sõsarrühma, kuigi GS01 rühma paiknemine ei olnud töös toetatud. Järgnevad fülogeneesianalüüsid kinnitasid BCG2 positsiooni seente sõsarrühmana, kuid näitasid, et GS01 võib olla hoopis mikrosporiidide sõsarrühm (Bass *et al.*, 2018; Tedersoo *et al.*, 2018b). Rühma rRNA geenijärjestusi on leitud hajusalt üle kogu maailma erinevatest mulla- ja veeproovidest ilma selge levikumustrita (Tedersoo *et al.*, 2018a). Eestist on selle rühma geenijärjestusi leitud Saadjärve veeproovist ja Saaremaalt Tagamõisast korjatud mullaproovist (Tedersoo avaldamata andmed).

1.3. Varakult lahknunud seente roll veeökosüsteemides

Kuigi varakult lahknunud seente geenijärjestusi on leitud peaaegu kõikidest keskkonnaproovidest, siis on nende arvukus arvatavasti suurim mageveekogudes (Grossart *et al.*, 2016). Erinevate vetikaliikide ja vetikatel parasiteerivate seente hüperparasiitidena võivad nad olla olulised vetikaõitsengute ulatuse, kestvuse ja liigilise suksessiooni reguleerijad (Gleason *et al.*, 2012). Näiteks hüperparasiit *Rozella polyphagi* võib suurendada silmviburlaste (*Euglena*) osakaalu vetikaõitsengute ajal, kuna ta nakatab silmviburlastel parasiteerivat viburseent *Polyphagus euglenae* (Gleason *et al.*, 2014). Varakult lahknunud seened võivad olla olulised ka mageveekogude toitainete ringluses. Suurte mõõtmetega või koloniaalsed fütoplanktoni rühmad (nt ränivetikad ja filamentsed tsüanobakterid) on enamusele zooplanktonile söödamatud, mistõttu peab toitainete liikumine toimuma fütoplanktonil parasiteerivate seenerühmade zoosporide vahendusel (ingl *mycoloop*; Kagami *et al.*, 2014). Lisaks võib endoparasiitsete seente energia ülekannet suurendada

asjaolu, et nad ei kuluta energiat sporangiumi kesta moodustamiseks, vaid indutseerivad seda peremehel ise tekitama (Gleason *et al.*, 2012).

1.4. Metatriipkoodistamine

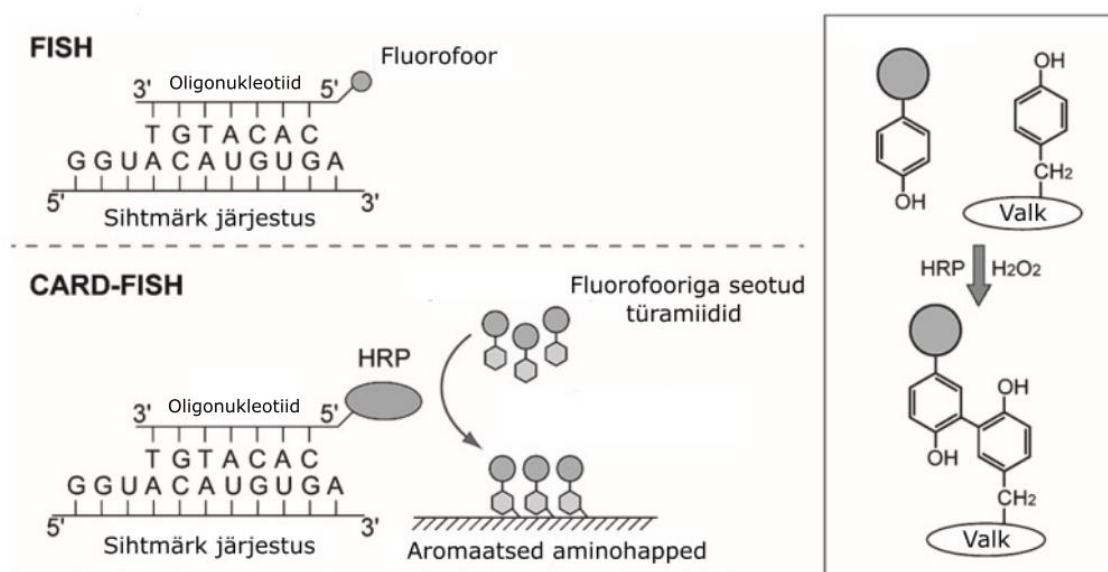
Metatriipkoodistamine on meetod, kus kindla geneetilise markeri alusel tuvastatakse kõik keskkonnaproovis leiduvad organismid (Ruppert *et al.*, 2019). Seente puhul on kokkuleppeliselt standardseks markeriks võetud rRNA geenide vahel asuv ITS regioon, kuna see võimaldab enamuse seente puhul kuni perekonnani määramist (Schoch *et al.*, 2012). Kõrgemate taksonite puhul peab aga kasutama evolutsiooniliselt konservatiivsemaid 18S või 28S rRNA geenijärjestusi (Tedersoo *et al.*, 2018b). Metatriipkoodistamise laia levikut on võimaldanud suure läbilaskevõimega (ingl *high throughput sequencing* ehk HTS) sekveneerimismeetodite rakendamine, mis erinevalt Sangeri sekveneerimisest võimaldavad keskkonnaproovist korraga sekveneerida tuhandeid erinevate organismide järjestusi (Piwosz *et al.*, 2021). Saadud sekveneerimisandmeid on edasi võimalik kasutada erinevates analüüsides, et leida statistiliselt olulisi seoseid erinevate keskkonnategurite (pH, kliimavõõde, jm) ja järjestuste esinemise ning arvukuse vahel (Tedersoo *et al.*, 2020, 2018a). Samas võimaldab selline lähenemine ainult oletada taksonite morfoloogilisi ja ökoloogilisi kohastumisi, mistõttu on varakult lahknunud seente täpsema morfoloogia ja eluviisilise mitmekesisuse uurimiseks vaja kombineerida metatriipkoodistamist teiste molekulaarsete meetoditega (nt FISH) (Piwosz *et al.*, 2021).

1.5. FISH ja CARD-FISH

Metatriipkoodistamise ja kultuuris kasvatamise kõrval on üks levinumaid meetodeid keskkonnaproovis leiduvate mikroorganismide kirjeldamiseks *in situ* fluorestsentshübridisatsioon ehk FISH (Rudkin ja Stollar, 1977). Meetodi puhul disainitakse olemasolevate rRNA geenijärjestuste põhjal sihtmärk organismi rRNA-ga komplementaarsed üheaheelalised DNA oligonukleotiidid, mis on 5' või 3' otsast märgistatud fluorofooriga (joonis 6). Seejärel viiakse läbi hübridisatsioon, kus sihtmärkorganismi ribosoomidega seotakse oligonukleotiidid, misjärel on fluorestsentsignaali järgi võimalik uuritav organism keskkonnaproovist tuvastada kasutades selleks fluorestsentsmikroskoopi või rakusorteri (Kubota, 2013). Siiski ei pruugi tavapärane FISH anda väiksemate organismide visualiseerimisel keskkonnaproovist piisavalt tugevat signaali, kuna ribosoomide hulk rakkudes võib olla liiga väike või keskkonnaproovis leiduvad autofluorestseeruvad osakesed ei võimalda uuritavat signaali eristada (Kubota, 2013). Seetõttu on välja töötatud CARD-FISH meetoodika, mis võimaldab tavalise FISH

metoodikaga võrreldes anda kuni 20 korda tugevama signaali (Kerstens *et al.*, 1995). CARD-FISH-i puhul hübridiseeritakse ribosoomi mädarõika peroksüdaasiga (HRP) märgistatud oligonukleotiididega. Vesinikperoksiidi juuresolekul oksüdeerib HRP türamiidi molekule, millele on lisatud fluorofoorid. Oksüdeerunud türamiidid seonduvad aromaatsete aminohappejääkidega (nt türosiin) oligonukleotiidi läheduses, mis võimaldab suurel hulgal fluorofooridel sihtmärkjärjestuse lähedale seonduda (joonis 6). Seetõttu on ka signaal tugevam kui tavalise FISH-i meetodi puhul (Kubota, 2013).

CARD-FISH meetodil on siiski ka mitmeid puudusi. Esiteks, tulenevalt HRP molekulide suurusest võrreldes tavaliste fluorofooridega, on rakkude läbilaskvust enne hübridiseerimist vaja suurendada. Kuna selleks kasutatavad meetodid on tihti destruktiivsed võib see põhjustada rakkude kadu (Kubota, 2013). Samas ei tõstnud varakult lahknenuid seenerühmadel laborinimedega LKM11 ja CM1.1 kitinaasiga töötlus hübridiseerinud rakkude koguarvu, mistõttu ei pruugi see siiski alati vajalik olla (Jones *et al.*, 2011). Teiseks on meetodika spetsiifilisuseks oluline, et keskkonnas oleks eelnevalt endogeensed peroksüdaasid deaktiveeritud (Kubota, 2013). Kuna senimaani puudub ühtne protokoll, mis võimaldaks seda kõikide keskkonnaproovide ja organismide puhul teha, siis on uute keskkonnaproovide ja tundmatute mikroorganismide puhul vaja meetodit alati vähemal või suuremal määral modifitseerida. Vaatamata meetodi probleemidele on CARD-FISH-i edukalt kasutatud erinevate *Rozellomycota* rühmade morfoloogiliste tunnuste ja ökoloogia kirjeldamiseks (Chambouvet *et al.*, 2019; Jones *et al.*, 2011; Priest *et al.*, 2021). Siiski on enamus metatriipkoodistamisega leitud varakult lahknenuid seente rühmadest senimaani CARD-FISH meetodiga kirjeldamata. Üks selline rühm on ka *Basal clone group 2*.



Joonis 6. FISH ja CARD-FISH meetodite võrdlus. FISH puhul seotakse sihtmärkorganismi rRNA-ga komplementaarsed oligonukleotiidid, mis on enamasti 5' otsast märgistatud fluorofooriga. CARD-FISH puhul toimub rRNA-ga seondumine aga komplementaarsete oligonukleotiididega, mis on märgistatud mädarõika peroksüdaasiga (HRP). Vesinikperoksiidi olemasolul oksüdeerib HRP fluorofooriga märgistatud türamiidi molekule, mis seejärel saavad seonduda aromaatsetele aminohapetele (nt türosiin) HRP läheduses. Algne joonis võetud tööst Kubota (2013).

2. Praktiline osa

2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks oli välja töötada CARD-FISH protokoll, mis võimaldaks erinevatest keskkonnaproovidest visualiseerida potentsiaalseid BCG2 rühma isendeid ja mida oleks edaspidi võimalik kasutada teiste mikroorganismide visualiseerimiseks. Lisaks otsustati kogutud proovidega viia läbi ka metatriipkoodistamise uuring. Kuna rühma levikumustrid on teadmata, siis koguti töö tegemiseks vajalikud proovid võimalikult lähedalt, Tartust. Mullaproov koguti 15.12.2020 Annelinnast (58.374723°N; 26.775245°E). Mageveeproovidena kasutati 10.08.2020 ja 22.03.2021 Emajõe Turu silla alt (58.379414°N, 26.730607°E) veepinna lähedalt kogutud veeproove. Proove säilitati 4 °C juures.

2.2. DNA eraldamine, amplifitseerimine ja sekveneerimine

Nii mullaproovist kui veeproovidest DNA eraldamiseks kasutati *DNeasy PowerSoil Kit*'i (MoBio, Carlsbad, USA). Mullaproovi puhul kaaluti selleks umbes 0,5 g mulda Eppendorfi tuubi. Veeproovide puhul lasti eelnevalt u 100 ml veeproovi läbi filtrihooidikus (*Sartorius*) oleva 25 mm läbimõõdu ja 3 µm poorisuurusega valge *Whatman* polükarbonaatfiltriga, misjärel filter eemaldati ja pandi Eppendorfi tuubi. Järgnevalt toimiti lähtuvalt tootja instruksioonidest.

DNA amplifitseerimine PCR meetodil viidi läbi viie praimeripaariga, millest kolme kasutati mullaproovi peal (EUK575F-CladeAssuR, CladeAssuF-ITS4ngsUNI, BCG2f-Euk895R) ja kahte veeproovide peal (S515F-ITS2cladeAseq ja CladeA SSUF-ITS4ngsUni) (lisa 1). Praimerite EUK575F, ITS4ngsUNI, Euk895R ja S515F 5' otsas oli 12 nukleotiidi pikkune indeksjärjestus, mis võimaldas hiljem leida, millised järjestused millisele proovile kuulusid. CladeAssuR, CladeAssuF ja ITS2cladeAseq on GS01 ning BCG2 rühmale spetsiifilised praimerid, millega on varem mõlema rühma geenijärjestusi õnnestunud amplifitseerida

(Tedersoo et al., 2017). BCG2f praimer oli käesoleva töö tarbeks disainitud praimer, mis *in silico* seondub ainult BCG2 rühmaga (lisa 1). Praimeripaarid EUK575F-CladeAssuR ja BCG2f-Euk895R amplifitseerivad 18 rRNA algusregiooni, praimeripaarid CladeAssuF-ITS4ngsUNI, S515F-ITS2cladeAseq ja CladeAssuF-ITS4ngsUni amplifitseerivad 18S rRNA geeniregiooni lõppu ja täielikult ITS regiooni.

PCR viidi läbi kahes korduses, kus iga proovi lõppmaht oli 25 µl (5 µl HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis BioDyne, Eesti), 0,5 µl kumbagi praimerit (20 µM), 1 µl eraldatud DNA-d ja 18 µl Milli-Q vett). Lisaks tehti reagentide saastuse kontrollimiseks kontrollproov, kuhu ei lisatud DNA-d. PCR tsükkel oli järgmine: 95 °C 15 min, 40 tsüklit 94 °C 40 s, 55 °C 40 s; 72 °C 80 s ja viimaks 72 °C 10 s. PCR produktid visualiseeriti geelelektroforeesiga 1% agarosgeelil (1 g agarosi ja 100 ml 1× TRISboraat-EDTA e TBE) etiidiumbromiidiga (0,01 µg/µl). PCR-produktide suuruse hindamiseks kasutati 100 bp DNA suurusmarkerit (Solis BioDyne, Eesti). Agarosgeeli pilt tehti UV transilluminaatoriga. Produktid puhastati FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit'iga (Favorgen™, Viin, Austria) lähtuvalt tootja instruksioonidest. Proovid sekveneeriti Norras Oslo Ülikooli sekveneerimiskeskuses, kasutades selleks Pacific Biosciences (PacBio) sekveneerimisplatvormi Sequel II. Bioinformaatiline analüüs on kirjeldatud Tedersoo *et al.* (202x) avaldamata käsikirjas.

2.3. CARD-FISH oligonukleotiidi disain

CARD-FISH meetodika kasutamiseks oli vaja esmalt disainida BCG2 rühma isendite 18S või 28S rRNA-ga seonduv oligonukleotiid. Selleks vajalike geenijärjestustena kasutati Leho Tedersoo varasemalt kokku kogutud BCG2 geenijärjestusi. Teiste varakult lahknunud seente järjestuste valimisel lähtuti Bass *et al.* (2018), Tedersoo *et al.* (2020) ja Galindo *et al.* (2019) artiklites kasutatud andmetest. Järjestused joondati MAFFT ver 7 veebirakendusega vaikimisi parameetritega (Kato *et al.*, 2019). Aligneering on kättesaadav PlutoF andmebaasist (<https://plutof.ut.ee/#/filerepository/view/4333187>). Järgnevalt töötati järjestustega programmis MEGA-x ver 10.2. (Kumar *et al.*, 2018). BCG2 rühmaga seonduva oligonukleotiidi disainimisel arvestati, et see oleks 15–30 nukleotiidi pikk, sellel puuduks sekundaarstruktuur ja et vähemalt üks valepaardumine teiste organismidega jääks oligonukleotiidi keskele. Sekundaarstruktuuri hindamiseks kasutati veebirakendust *Oligoevaluator*TM <http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>. Oligonukleotiidi optimeerimisel kasutati veebirakenduse mathFISH *General Analysis* tööriista (Yilmaz *et al.*, 2011). Spetsiifilisuse kontrollimiseks kasutati SILVA *testprobe* tööriista (Pruesse et al.,

2007) sättega maksimaalselt viis valepaardumist (ingl *mismatch*) nii REF kui ka REFNR andmebaaside vastu. Vastete potentsiaalse hübridiseerumise efektiivsust uuriti täpsemalt veebirakenduse mathFISH *Mismatch Analysis* tööriistaga (Yilmaz *et al.*, 2008). Disainitud sond telliti firmast *Biomers* (Ulm, Saksamaa; tabel 1).

Tabel 1. Disainitud sondi nimi, järjestus ja seondumine NCBI *nucleotide* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) geenipanga BCG2 geenijärjestusel HQ191300.

Nimi	Järjestus	Seondumine referentsjärjestusel
hBCG2_2	5' HRP-agaccactactgtaccaacttgag 3'	Seondub BCG2 SSU positsioonidele 281–304 (NCBI <i>nucleotide</i> andmebaasi sekvensil HQ191300)

2.4. Mullaproovide fikseerimine ja filtrile kandmine

Mullaproovide fikseerimiseks kasutati Eickhorst ja Tippkötter (2008) kirjeldatud meetodit. Igast mullaproovist kaaluti Eppendorfi tuubi 0,5 g mulda ja lisati 1,5 ml metanooliga stabiliseeritud 4% formaldehüüdi (pH 7; VWR Chemicals, USA). Seejärel inkubeeriti proove 5 h 4 °C juures ja pesti kaks korda 1×PBS puhvriga, tsentrifuugides proovi peale igat pesemist 5 minutit 10000 rpm (Centrifuge 5424R) 4 °C juures. Proovide säilitamiseks lisati proovidele 1,5 ml 1×PBS/96% etanool (1/1) lahust ja hoiti -20 °C juures.

Mullaproovi filtritele kandmiseks kasutati samuti Eickhorst ja Tippkötter (2008) protokollit, mida küll käesoleva töö käigus osaliselt muudeti. Esmalt tehti algsest mullalahusest kümnekordne lahjendus 1×PBS/96% etanooli segus (1/1). Seejärel võeti tehtud lahusest autorite kirjeldatust suurem kogus proovi (200 µl) ja lahustati omakorda 10 ml MilliQ vees. Saadud lahus lasti läbi süstla, mille otsa oli kinnitatud filtrihoidik (*Sartorius*) 25 mm läbimõõdu ja 3 µm poorisuurusega valge *Whatman* polükarbonaatfiltriga. Rakkude kinnitamiseks filtrile prooviti esmalt autorite kirjelduse järgi kasta filtrit Petri tassil olevasse eelsoojendatud (c. 40 °C) 0,2% agarose lahusesse. Kuna sellega kaasnes silmnähtav proovi kadu, siis otsustati agarose lahus lasta läbi süstla. Filtri kuivatamiseks kasutati Rappé (2013) (https://hahana.soest.hawaii.edu/cmoreserver/summercourse/2013/documents/data2013/CARDFISH_rappe_2013.pdf) kirjeldatud meetodit, kus filter asetati alusklaasi peal olevale parafilmile ja kuivatati kuumakapis 40 °C juures. Seejärel eemaldati filter parafilmilt 96% etanooliga ja jäeti 10 minutiks kuivama. Rakkude läbilaskvuse suurendamisest käesolevas töös loobuti, kuna varasemalt on näidatud, et see ei ole varakult lahknunud seente puhul vajalik (ptk 1.5). Endogeensete peroksüdaaside deaktiveerimiseks otsustati kasutada nõrka

soolhappe lahust, kuna varasemalt on näidatud seda kui efektiivset viisi peroksüdaaside deaktiveerimiseks (Liu *et al.*, 2006). Selleks inkubeeriti filtrit Petri tassis 0,01 M soolhappes 10 minutit, misjärel pesti filtrit kaks korda MilliQ veega ning dehüdreeriti 96% etanooliga (Rappé, 2013). Siis lõigati filtrid kaheksaks tükiks, kasutades selleks eelnevalt 70% etanooliga steriliseeritud žiletitera. Filtritükke säilitati -20 °C juures.

2.5 Mageveeproovide fikseerimine ja filtrile kandmine

Mageveeproovide fikseerimiseks kasutati Rappé (2013) kirjeldatud meetodit, mida samuti käesoleva töö käigus muudeti. 25 ml veeproovi fikseeriti metanooliga stabiliseeritud 4% formaldehüüdiga (lõplik kontsentratsioon 2%) 1 h toatemperatuuril või vähemalt 6 h 4 °C juures. Peale veeproovi pesti filtrit kaks korda 1×PBS puhvriga ja lisaks dehüdreeriti Chambouvet *et al.* (2019) protokoll järgi 3 korda kasvavate kontsentratsioonidega (50%, 70%, 96%) etanooli lahustega. Järgnev töötlus oli sama, mis mullaproovide puhul.

2.6. *In situ* fluorestentshübridisatsioon

In situ fluorestentshübridisatsiooniks kombineeriti ja modifitseeriti labori võimalusi arvestades Rappé (2013) ning Chambouvet *et al.* (2019) kirjeldatud protokolle. Esimesed kolm katseseeriat tehti mullaprooviga, kus igas katseseerias kasutati korraka kolme filtritükki. Seejärel viidi nii suvel kui ka kevadel kogutud veeprooviga läbi üks katseseeria, kus vastavalt kasutati nelja ja kolme filtritükki. Lisaks tehti iga katseseeria käigus ka üks kontrollproov, millele oligonukleotiidi ei lisatud. Igat filtritükki inkubeeriti eraldi Eppendorfi tuubis 450 µl hübridisatsioonilahuses (900 mM NaCl; 20 mM Tris-Cl, pH 7,5; 10% dekstraan-sulfaat; 0,01% SDS; 35% formamiid; 2% blokeerimislahus (*Roche*); 0,25 ng/ml oligonukleotiidi) vähemalt 4 h 37 °C juures termostaadis (*Thermomixer comfort*). Üleliigsete oligonukleotiidide eemaldamiseks pesti filtritükke 30 minutit 10 ml pesulahuses (5,2 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,01% SDS; 20 mM Tris-Cl, pH 7,5) 39 °C juures kuumakapis. Järgneva ensüümreaktsiooni võimendamiseks inkubeeriti filtritükke 15 minutit TNT puhvril toatemperatuuril (200 mM Tris-Cl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,1% Tween 20).

CARD-FISH reaktsiooni läbiviimiseks kasutati Eickhorst ja Tippkötter (2008) kasutatud töölahust, kus 1×PBS puhvri asemel kasutati tootja soovitatud Tris-Cl puhvrit ja 5 korda kõrgemat (v.a esimene katse mullaprooviga) türamiidide kontsentratsiooni (0,6 µl Alexa Fluor™ 488 Tyramide Reagent (*ThermoFisher*); 0,3 µl 0,15% H₂O₂; 0,3 µl blokeerimislahus (*Roche*); 28,8 µl 1 M Tris-Cl, pH 7,4). Igat filtritükki inkubeeriti eraldi pimedas ja toatemperatuuril 30 min parafilmile pipeteeritud 30 µl töölahuses. Ensüümreaktsiooni

peatamiseks inkubeeriti igat filtritükki eraldi Eppendorfis 2 ml TNT puhvril 2×20 minutit 55 °C juures termostaadis. Seejärel pesti filtreid 2×MilliQ veega ja dehüdreeriti 96% etanooliga.

Rakutuumade värvimiseks DAPI-ga kasutati Kim *et al.* (2011) kirjeldatud protokoll. Iga filtritükki inkubeeriti pimedas 5 min parafilmile pipeteeritud 20 µl DAPI-s (1,5 µg/ml). Üleliigne värv eemaldati filtritükkidelt pestes neid Petri tassil 5 min MilliQ veega ja dehüdreeriti 80% etanooliga. Kuivamise järel pandi iga filtritükk eraldi mikroskoobi alusklaasile, pipeteerides nende peale tootja instruksioonidest lähtuvalt 20 µl fluorestentssignaali kadumist takistavat *Antifade* segu (*BosterBio*, AR1109). Seejärel lisati filtritüki peale pealisklaas, mis kinnitati küünelakiga. Alusklaase hoiti esmalt 12 h toatemperatuuril, misjärel sai neid säilitada 4 °C juures valguse eest varjatult. Peale proovide esmast mikroskopeerimist eemaldati filtritelt uuesti pealisklaas, kasutades selleks 96% etanooli. See oli vajalik, et filtril olevaid rakke saaks värvida tselluloosi ja kitiiniga seonduva värviga *Calcofluor-White* (CFW; *Sigma-Aldrich*) tuvastamaks hübridiseerunud rakkudel potentsiaalset rakukesta. Värvimiseks inkubeeriti filtritükke 10 min parafilmile pipeteeritud 20 µl 1% CFW lahuses, misjärel üleliigne värv eemaldati filtritükkidelt pestes neid Petri tassil 5 minutit MilliQ veega ja 5 minutit 80% etanooliga (Rasconi *et al.*, 2009). Järgnevalt pandi filtritele pealisklaas tagasi, kasutades selleks eelnevalt kirjeldatud meetodit.

2.7 Mikroskopeerimine

Filtreid mikroskopeeriti Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis (TÜMRI) asuva Olympus BX61 fluorestentsmikroskoobiga. Valgusallikana kasutati elavhõbedalampi võimsusega 100W. Alexa fluor 488 ergastamiseks kasutati lainepikkust 488/40 ja signaali tuvastamiseks madalpääsu (ingl *longpass*) emissioonifiltrit 510/lp. Madalpääsufiltri kasutamine võimaldas rohelise signaali järgi eristada hübridiseerunud rakke kollaselt või punaselt autofluoresteeruvatest taustaobjektidest. DAPI ergastamiseks kasutati lainepikkust 365/10 ja signaali tuvastamiseks emissioonifiltrit 440/20. Pildid tehti kas 40x tavaobjektiiviga või 100x õliimmersioonobjektiiviga, kasutades selleks Olympus XM10 (Olympus Corporation) monokromaatset kaamerat Olympus cellSens 1.8.1 tarkvaraga (Olympus Corporation). Esimesena tehti pildid Alexa fluor 488-ga värvitud rakkudest, kuna DAPI ergastamine põhjustas kiiret Alexa fluor 488 fluorofooride kustumist. Alexa fluor 488 ja DAPI signaaliga piltide liitmisel ja taustamüra vähendamiseks soovitud signaali paremaks tõlgendamiseks kasutati programmi Icy ver 2.0.3.0. (De Chaumont *et al.*, 2012). Suvel kogutud veeproovis leiduvate rakkude ruumilise struktuuri uurimiseks kasutati TÜMRI-s

asuvat konfokaalmikroskoopi Olympus Fluoview FV1000 (Olympus Corporation) laseritega 405 nm (56 mW), 488 nm (40 mW) ja 559 nm (100 mW) 60x suurendusega vesiimmersioonobjektiiviga Olympus Fluoview 4.0a tarkvaraga (Olympus Corporation).

3. Tulemused

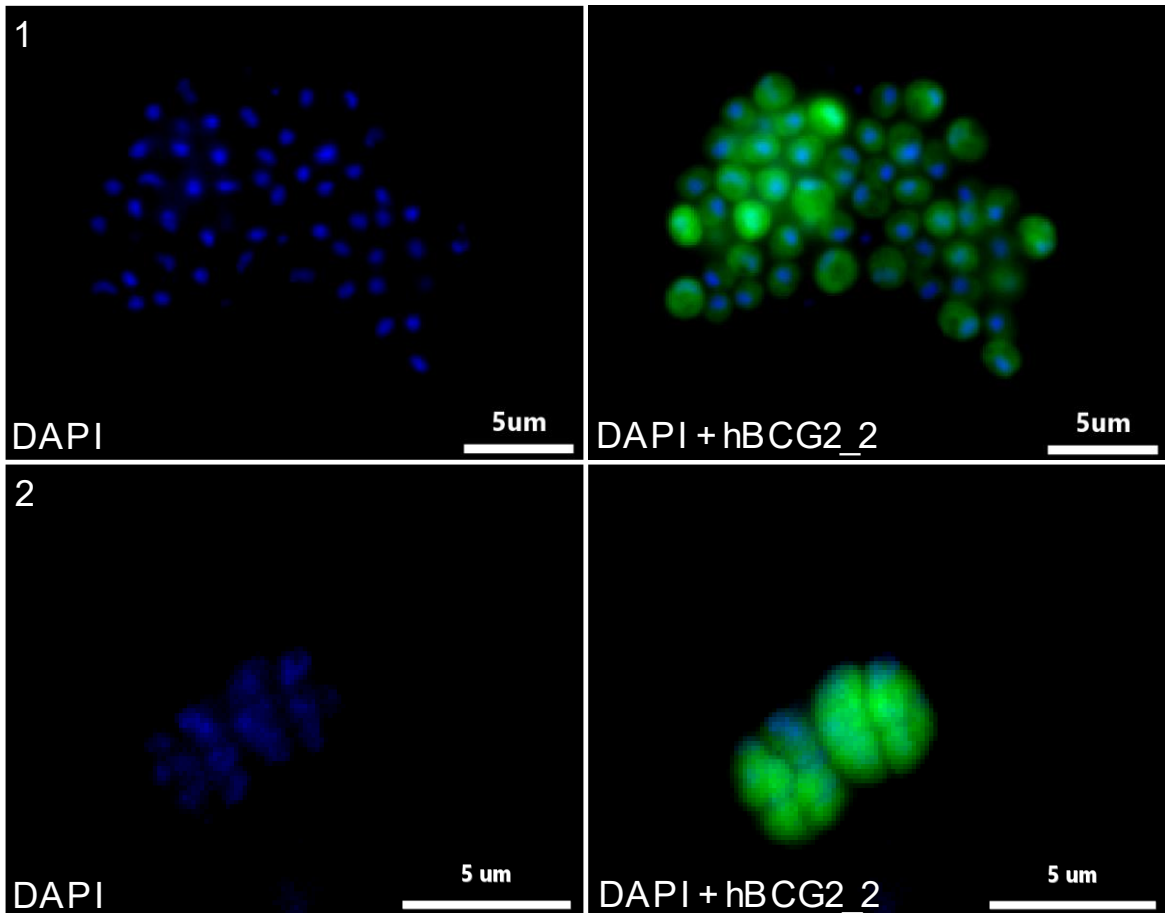
3.1 .CARD-FISH

3.1.1. Oligonukleotiidi spetsiifilisus *in silico*

SILVA *testprobe* tööriistaga oligonukleotiidi spetsiifilisuse kontrollimisel saadi viie valepaardumise kasutamisel REFNR andmebaasiga kokku 128 vastet ja REF andmebaasiga 304 vastet, millel kõigil (v.a BCG2 rühmal) oli neli või rohkem valepaardumist, mis peaks tagama oligonukleotiidi spetsiifilisuse. Siiski võis MathFISH *mismatch analysis* järgi töös kasutatud katsetingimuste juures toimuda hübriidiseerumine lisaks BCG2 rühmale ka NCBI *nucleotide* andmebaasi sekventsiga AB287983, mis kuulub seente hõimkonna *Kickxellomycota* perekonda *Coemansia*. Samas ei toimu seondumist teiste andmebaasis olevate *Coemansia* sekventsidega, mistõttu võis leitud järjestus olla ka vigane.

3.1.2. Annelinna mullaproov

CARD-FISH meetodit katsetati esmalt mullaproovi peal. Esimeses katses kasutati tootja soovitatust (1/100) väiksemat türamiidide kontsentratsiooni (1/250), kuna Schmidt *et al.* (2012) hinnangul tekitab see liigset taustamüra. Selle töölahusega ei õnnestunud visualiseerida proovist ühtegi rakku, mistõttu katsetati järgnevalt töölahust, kus türamiidide kontsentratsioon oli seatud 5 korda kõrgemaks (1/50). Kahes järgnevas katseseerias õnnestus sellega tuvastada kahte erinevat tüüpi hübriidiseerunud rakke, ilma et taustamüra oleks märgatavalt suurenenud. Esimene rakutüüp oli ümmargune, 1,5–2 µm läbimõõduga ja esines enamasti koos teiste samasuguste rakkudega (joonis 7, 1). Teine rakutüüp esines 3–5 µm läbimõõduga rakkude kobaratena ja oli erinevalt esimesest rakutübist palju haruldasem (joonis 7, 2). CFW värvimisel ükski rakk ei värvunud, mis näitab, et mõlemal rakutübil puudub kas tselluloosist või kitiinist rakukest.



Joonis 7. Pildid hübriidiseerunud rakkudest mullaproovis. 1) eraldiseisvad rakud; 2) kobaras rakud. Vasakpoolsed pildid näitavad DAPI signaali, parempoolsed on liitpildid DAPI ja Alexa fluor 488 signaalist; mõlemale signaalile on antud valevärvid programmis Icy.

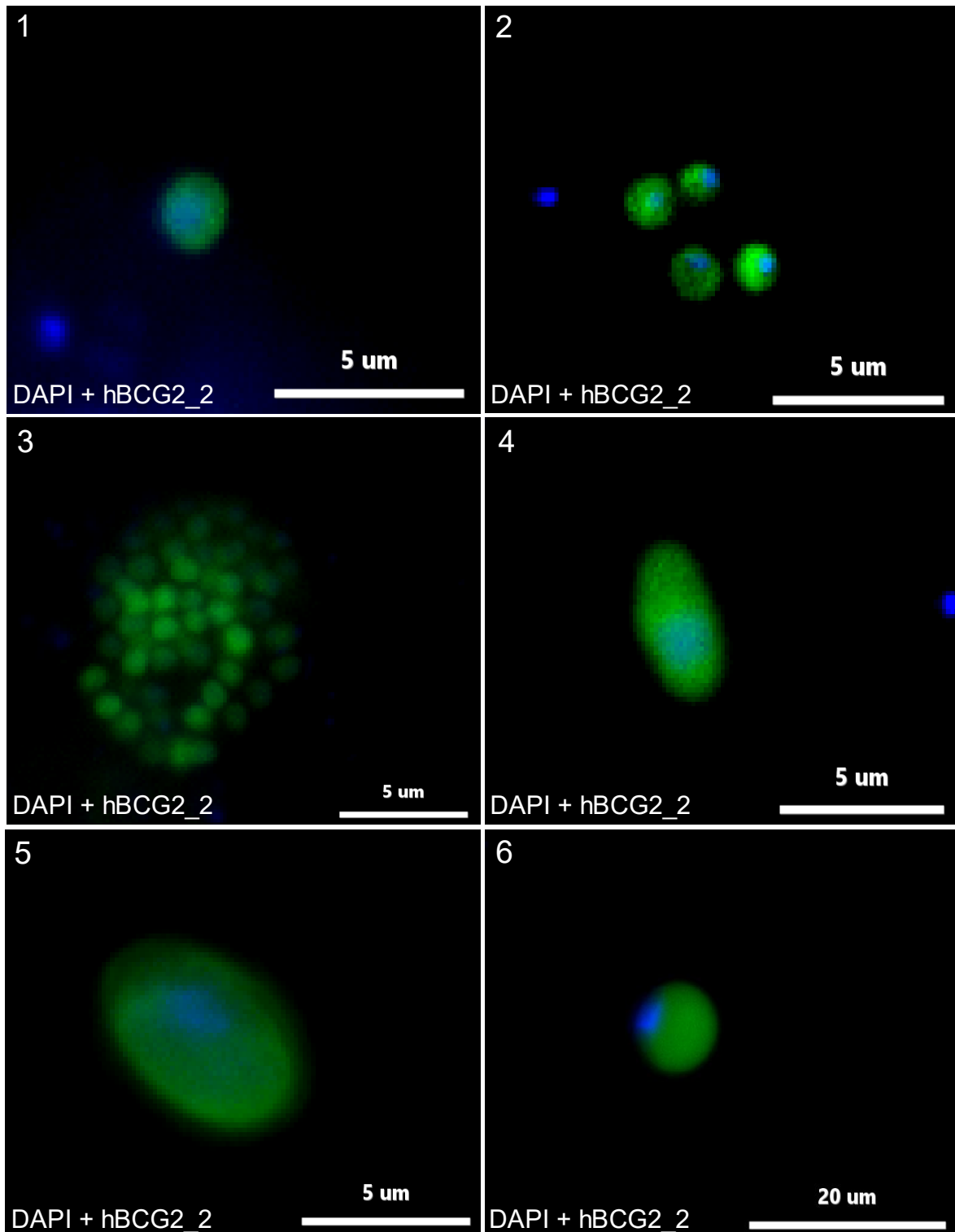
3.1.3. Emajõe veeproovid

Kuna mullaproovi peal kasutatud protokolliga õnnestus rakke visualiseerida, siis katsetati seda edasi veeproovide peal. Nii kevadel kui ka suvel kogutud veeproovidest leiti erineva morfoloogia ja suurusega hübriidiseerunud rakke, millest kõige levinum rakutüüp oli ümmargune ja 1–2 μm läbimõõduga ning mis võis esineda kas üksikult või koos teiste samasuguste rakkudega (joonis 8, 1–3). Teine rakutüüp oli suurem (4–10 μm), väliskujult kas piklik või ümmargune ja kõige väiksema arvukusega (joonis 8, 4–6). Kolmas potentsiaalne rakutüüp oli seotud erinevate vetikarakkudega (joonis 9, lisa 2), kusjuures konfokaalmikroskoobi piltide järgi tuli signaal vetikarakkude seest (lisa 2). Signaal võis raku täita kas osaliselt (joonis 9, 2; lisa 2, joonis 2) või täielikult (joonis 9, 1,3 ja 4; lisa 2 joonis 1), kusjuures viimase variandi puhul võis vetikarakul puududa ka rakutuum, kuigi see kõrvalasuvatel rakkudel oli olemas (joonis 9, 4; lisa 2, joonis 1). Harva võis DAPI

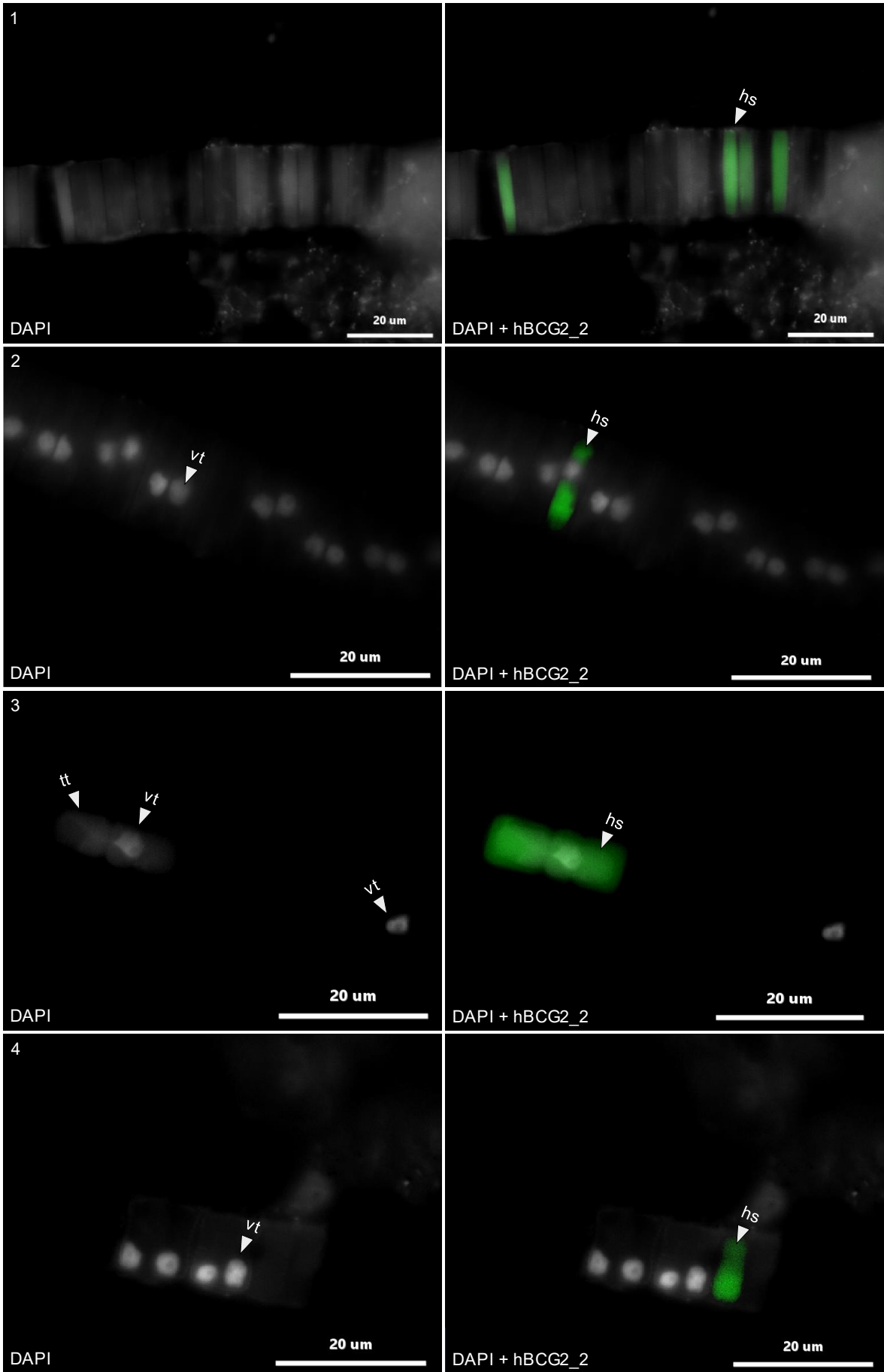
ergastamisel näha hübridiseerunud vetikarakkus ka nõrgemat vetika rakutuumast erinevat signaali (joonis 8, 3). Ükski leitud rakk ei värvunud ka siin CFW värvimisel.

3.1.4. Kontrollproovid

Iga katseseeria käigus valmistati lisaks ette üks kontrollproov, mille hübridisatsiooni lahusesse oligonukleotiidi ei lisatud. See oli vajalik, et välistada türamiidide ebaspetsiifilist seondumist ebapiisava endogeensete peroksüdaaside deaktivatsiooni tõttu. Lisaks on Piwosz *et al.* (2021) märkinud, et türamiidid võivad ebaspetsiifiliselt seonduda ränivetikate ja dinoflagellaatide rakukestadega. Kevadel kogutud veeprooviga tehtud katseseeria kontrollproovist tuvatati kaks 2 µm läbimõõduga värvunud ümmargust rakku. Samas kuna teistest kontrollproovidest neid kordagi ei leitud, siis võis tegu olla ka proovide vahel toimunud ristisaastusega. Samuti esines veeproovides osadel vetikarakkudel nõrk kollakasroheline autofluorestsents, mida on täheldanud ka Tang ja Dobbs (2007). Erinevalt hübridiseerunud rakkudest oli see aga palju nõrgem ja ei kustunud erinevalt hübridiseerunud rakkudest ka peale DAPI ergastamist (ptk 2.7).



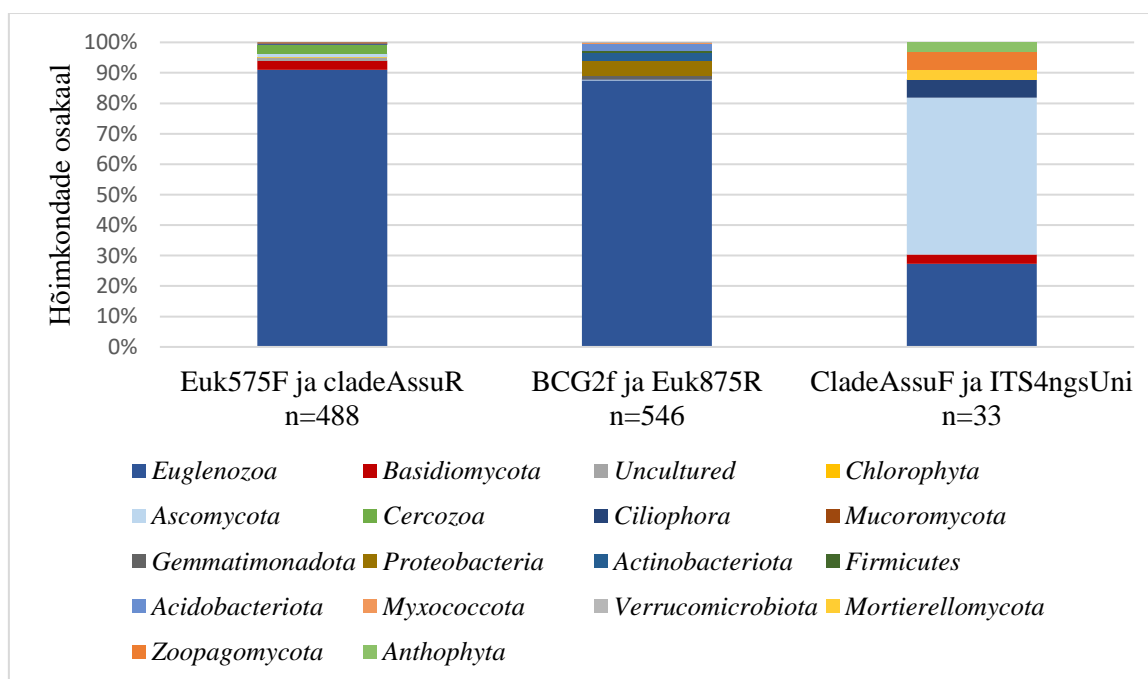
Joonis 8. Näiteid erineva morfoloogia ja suurusega vabalt elavatest hübridiseerunud rakkudest mageveeproovides. 1–3) 1–2 μm läbimõõduga rakud; 4) ja 5) üksikud piklikud rakud; 6) üksik ümmargune rakk. Fotodel on liidetud nii Alexa fluor 488 ja DAPI signaalid ja mõlemale signaalile on antud valevärvid programmis Icy.



Joonis 9. Pildid Alexa fluor 488 signaaliga vetikatest Emajõe veeproovides. Vasakpoolsed fotod näitavad DAPI signaali, parempoolsetel pildidel on liidetud kokku nii DAPI kui ka Alexa fluor 488 signaal; Alexa fluor 488 signaalile on antud roheline valevärv programmis Icy. vt – vetika rakutuum; tt – tundmatu DAPI kanali signaal; hs – Alexa fluor 488 signaal.

3.2. Metatriipkoodistamise tulemused

Potentsiaalsete rühma isendite tuvastamiseks sekveneerimisega kasutati *PacBio* Sequel II sekveneerimisplatvormi viie praimeripaariga, millest kolme kasutati mullaproovi ja kahte veeproovide peal (ptk 2.2.). Käesoleva töö valmimise ajaks ei ole veeproovide sekveneerimistulemusi veel käes. Erinevate praimeripaaridega sekveneeritud geenijärjestustest õnnestus hõimkonnani määrata 1067 OTU-t, millest aga ükski ei kuulnud BCG2 rühmale. See viitab kas BCG2 rühma puudumisele või selle madalale arvukusele mullaproovis (joonis 10). Kuigi teoreetiliselt peaks kasutatud praimeripaarid amplifitseerima ainult GS01 ja BCG2 rühmasid, siis töös amplifitseerusid väga erineva taksonoomilise kuuluvusega rühmad (joonis 10). Arvatavasti tulenes see PCR-i liiga suurest tsükli arvust (40 cyc) ja madalast seondumistemperatuurist (55 °C), mistõttu amplifitseerusid ka neist erinevad rühmad.



Joonis 10. Mullaproovist erinevate praimeritega sekveneeritud OTU-de taksonoomiline kuuluvus ja nende osakaal.

4. Arutelu

Käesoleva töö praktilise osa põhieesmärk oli katsetada CARD-FISH meetodit ühe arvatavalt varaseima seenerühma *Basal clone group 2* (BCG2) isendite visualiseerimiseks. Töö tulemusena selgus, et kohandatud ja optimiseeritud protokoll sobib keskkonnaproovidest taksonite visualiseerimiseks. Samas tulenevalt asjaolust, et mullaproovist ei tulnud sekveneerimisel BCG2 rühma välja, siis vaatamata oligonukleotiidi spetsiifilisusele *in silico* seondus ta ikkagi ebaspetsiifiliselt tundmatute taksonitega. Tõenäoliselt ei olnud töös kasutatud katsetingimused piisavad, et tagada seondumise spetsiifilisust. Seetõttu tuleks sama oligonukleotiidiga protokollu edasi katsetada, kasutades madalamat oligonukleotiidide või türamiidide kontsentratsiooni, kõrgemat hübriidisatsiooni- ja pesemistemperatuuri ning suurema formamiidi kontsentratsiooniga hübriidisatsioonilahust, kuna need kõik vähendavad ebaspetsiifilise seondumise võimalust (Priest *et al.*, 2021).

Paraku ei võimalda CARD-FISH meetod ainult rakkude väliskuju järgi hinnata hübriidiseerunud rakkude taksonoomilist kuuluvust. Nii mullaproovist kui ka veeproovidest leitud kõige väiksemate rakkude puhul (1,5–2 µm) ei ole võimalik ka väita, kas tegu on prokarüootsete või eukarüootsete rakkudega, kuigi mullast leitud rakud on mulla prokarüootide kohta liiga suured. Reeglina jääb kerajate mullabakterite diameeter vahemikku 0,5–1,5 µm (Hasebe *et al.*, 1984). Samuti saab välistada pärmi-eluvormi, kuna rakud ei värvunud kitini ja tselluloosiga seonduva CFW värviga.

Vaatamata oligonukleotiidi ebaspetsiifilisele seondumisele sarnanevad Emajõe veeproovidest leitud hübriidisatsiooni signaaliga ränivetikad Chambouvet *et al.* (2019) CARD-FISH-iga visualiseeritud BCG1 isenditele erinevate ränivetikate sees. Seetõttu ei saa välistada ka võimalust, et osad veeproovidest leitud rakud (k.a. potentsiaalne endoparasiitne interaktsioon vetikatega) kuuluvad tõepoolest BCG2 rühmale. Endoparasiitset interaktsiooni võib näidata ka asjaolu, et mõnes vetikarakus puudus rakutuum, mis võib viidata kas selle fagotsütoosile või lagunemisele. Arroyo *et al.* (2018) leidsid BCG2 järjestusi mageveeproovide filtraatidest nii 8–15 µm kui 2–8 µm fraktsioonidest, mistõttu oletasid autorid, et rühmal võivad esineda erineva suurusega elustadiumid. Seega võib see näidata, et sarnaselt *Rozellomycota* ja *Aphelidiomycota* hõimkonna liikidele, võib ka BCG2 rühmal olla väiksem spoori ja tsüsti staadium ning suurem rakusisene staadium. Teisalt on teada ka teisi protiste, kes toituvad fagotroofselt vetikate tsütoplastast, näiteks nuuterlimakud (*Rhizaria*). Lisaks ei saa välistada ka võimalust, et värvunud vetikarakud on meetodist tulenev artefakt, millele võib viidata ka asjaolu, et enamuses vetikarakkudes puudus teise

organismi olemasolule viitav DAPI-ga värvunud rakutuum(ad). Seetõttu oleks ennatlik enne veeproovide sekveneerimistulemusi ühtegi leitud hübriidiseerunud rakku BCG2 rühmale kuuluvaks pidada.

Kuna käesolevas töös ei saanud kinnitust, et ükski hübriidiseerunud rakk kuulub BCG2 rühmale, siis on rühma isendite leidmiseks vaja teha korduskatseid kas sama oligonukleotiidiga või uute rühmaspetsiifiliste oligonukleotiididega ning teiste keskkonnaproovidega (nt Saadjärve veeproovidega, kust rühma on ka leitud). Edaspidi tuleks jätkata ka CARD-FISH-i kombineerimist metatriipkoodistamise meetoditega, et välistada meetodi piirangutest tulenevat ebaspetsiifikat. CARD-FISH meetodit oleks tulevikus võimalik kombineerida ka voolutsütomeetriaga (FACS), kuna see võimaldaks potentsiaalselt eraldada ja sekveneerida üksikuid BCG2 rakke (Neuenschwander *et al.*, 2015). Nii oleks võimalik tuvastada, kas BCG2 rühmal on olemas kõigile teistele seentele omaseid tunnuseid, näiteks müosiini domeeniga kitiini süntaasi geenide olemasolu (James *et al.*, 2013). Ka võiks uurida leitud rakkudel viburi olemasolu, kasutades selleks α -tubuliiniga seonduvaid ja fluorofooriga märgistatud TAT1 antikehasid (Chambouvet *et al.*, 2019; Jones *et al.*, 2011).

Kokkuvõte

Varakult lahknenuid seente liigirikkus on peamiselt teada vaid keskkonnaproovidest saadud geenijärjestuste kaudu, mistõttu on nende eluviisiline ja morfoloogiline mitmekesisus suuresti kirjeldamata. Kuna metatriipkoodistamine üksi ei võimalda kirjeldada keskkonnast uusi taksoneid, siis on nende kirjeldamiseks vaja kasutada uusi meetodeid, mis kombineerivad nii metatriipkoodistamise kui ka morfoloogilise andmestiku.

Töö teoreetiline osa andis ülevaate varakult lahknenuid seente taksonitest, nende ökoloogilisest rollist ja nende uurimiseks kasutatavatest meetoditest. Töö eksperimentaalse osa eesmärk oli kohandada varasemate uurimistöde alusel laboriprotokolli nii, et see võimaldaks Tartu Ülikooli mükoloogia laboris valmistada CARD-FISH-iga ette proove fluorestentsmikroskoobiga mikroskopeerimiseks. Uurimisobjektiks võeti varakult lahknenuid seenerühm laborinimega *Basal clone group 2* (BCG2), mida uuriti ühest mullaproovist ja kahest mageveeproovist. Selleks disainiti olemasolevate BCG2 rühma 18S rRNA geenijärjestuste põhjal rühma 18S rRNA-ga seonduv oligonukleotiid, mis *in silico* ei tohiks seonduda ühegi teise rühmaga. Lisaks viidi kogutud proovidega läbi metatriipkoodistamise uuring tuvastamiseks proovidest potentsiaalsete BCG2 rühma isendite rRNA geenijärjestusi.

Töös jõuti järgmiste järeldusteni:

- Töös kohandatud protokoll võimaldab keskkonnast eristada erinevaid mikroskoopilisi taksoneid.
- Vaatama oligonukleotiidi spetsiifilisusele *in silico* oli selle seondumine ebaspetsiifiline, mis viitab vajadusele muuta hübriidiseerumistingimusi.
- Siiski võib võimalik rakusisene interaktsioon mageveeproovis olevate erinevate vetikatega viidata endoparasitismile, mida on kirjeldatud ka teiste varakult lahknenuid seente puhul.
- Võimalusel tuleks CARD-FISH meetodit kasutada koos metatriipkoodistamisega, et välistada meetodi piirangutest tulenevat ebaspetsiifikat.
- BCG2 edasiseks uurimiseks tuleks kasutada uusi rRNA-ga seonduvaid BCG2-spetsiifilisi oligonukleotide ja tegema täiendavaid uuringuid teiste molekulaarsete meetoditega (nt voolutsütomeetria).

Visualization of an early diverging fungal lineage *Basal clone group 2* using the CARD-FISH method

Mihkel Suija

Summary

Early diverging fungi is a group of highly diverse fungi known from almost all environments and of which many are not yet described. Since metabarcoding alone cannot be used to describe novel taxa from the environment, new methods need to be developed that combine both morphological and metabarcoding data.

The theoretical part of the thesis gave an overview about early diverging taxa, their ecological role and two methods to which to study them. The aim of the experimental part was to experiment and optimize previous CARD-FISH protocols used to describe novel taxa (i.e early diverging fungi) and examine the possible cells of an early diverging fungal lineage called *Basal clone group 2* (BCG2) from soil and freshwater samples. To do that an oligonucleotide was designed based on the 18S rRNA sequences of BCG2 that should *in silico* bind only to the 18S rRNA region of BCG2. A metabarcoding study was also conducted to detect the possible rRNA gene sequences from the samples.

The following conclusions were made:

- The altered protocol used in the study can be used to study different microorganisms from various environments.
- Even though the designed oligonucleotide was specific to BCG2 *in silico* the hybridization was still unspecific and indicates the need to change hybridization conditions.
- A possible intracellular interaction with different algae from freshwater samples may hint to an endoparasitic interaction, since it has been described in other early diverging fungi;
- All future experiments with CARD-FISH should be accompanied by metabarcoding studies to rule out unspecificity.
- In the future new oligonucleotides targeting rRNA of BCG2 should be designed and other molecular methods (i.e flow cytometry) should be used to study the group further.

Tänuavaldused

Täna oma juhendajat Leho Tedersood igakülgse abi eest eksperimentide planeerimisel ja töö kirjutamisel. Samuti tänan Dmitri Lubenetsi ja Sergei Kopantšuki, kes olid suureks abiks mikroskopeerimisel ning Tõnis Orgu, kes andis töö tegemiseks vajaliku DAPI-t. Samuti tänan Rasmus Puuseppa ja Heidi Tamme igakülgse abi eest laboritööl. Sekvencerimisandmetega tehtud bioinformaatilise analüüsi eest tänan Vladimir Mikryukovi.

Kasutatud kirjandus

- Arroyo, A.S., López-Escardó, D., Kim, E., Ruiz-Trillo, I., Najle, S.R., 2018. Novel Diversity of Deeply Branching *Holomycota* and Unicellular *Holozoans* Revealed by Metabarcoding in Middle Paraná River, Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00099>
- Bass, D., Czech, L., Williams, B.A.P., Berney, C., Dunthorn, M., Mahé, F., Torruella, G., Stentiford, G.D., Williams, T.A., 2018. Clarifying the Relationships between *Microsporidia* and *Cryptomycota*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 65, 773–782. <https://doi.org/10.1111/jeu.12519>
- Berbee, M.L., James, T.Y., Strullu-Derrien, C., 2017. Early Diverging Fungi: Diversity and Impact at the Dawn of Terrestrial Life. *Annual Review of Microbiology* 71, 41–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020324>
- Calvez, T.L., Burgaud, G., Mahé, S., Barbier, G., Vandenkoornhuyse, P., 2009. Fungal Diversity in Deep-Sea Hydrothermal Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6415–6421. <https://doi.org/10.1128/AEM.00653-09>
- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73, 203–266. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1998.tb00030.x>
- Cavalier-Smith, T., 1987. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 326, 332–333. <https://doi.org/10.1038/326332a0>
- Chambouvet, A., Monier, A., Maguire, F., Itoiz, S., Del Campo, J., Elies, P., Edvardsen, B., Eikreim, W., Richards, T.A., 2019. Intracellular Infection of Diverse Diatoms by an Evolutionary Distinct Relative of the Fungi. *Current Biology*. 29, 4093-4101.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.074>
- Cheek, M., Lughadha, E.N., Kirk, P., Lindon, H., Carretero, J., Looney, B., Douglas, B., Haelewaters, D., Gaya, E., Llewellyn, T., Ainsworth, A.M., Gafforov, Y., Hyde, K., Crous, P., Hughes, M., Walker, B.E., Forzza, R.C., Wong, K.M., Niskanen, T., 2020. New scientific discoveries: Plants and fungi. *PLANTS, PEOPLE, PLANET* 2, 371–388. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10148>
- Corsaro, D., Walochnik, J., Venditti, D., Müller, K.-D., Hauröder, B., Michel, R., 2014a. Rediscovery of *Nucleophaga* amoebae, a novel member of the *Rozellomycota*. *Parasitology Research* 113, 4491–4498. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4138-8>
- Corsaro, D., Walochnik, J., Venditti, D., Steinmann, J., Müller, K.-D., Michel, R., 2014b. *Microsporidia*-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage

- Rozellomycota*. Parasitol Res 113, 1909–1918. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3838-4>
- De Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., 2012. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature methods* 9, 690–696.
- Eickhorst, T., Tippkötter, R., 2008. Improved detection of soil microorganisms using fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH). *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1883–1891. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.024>
- Galindo, L.J., Torruella, G., Moreira, D., Eglit, Y., Simpson, A.G.B., Völcker, E., Clauß, S., López-García, P., 2019. Combined cultivation and single-cell approaches to the phylogenomics of nuclearioid amoebae, close relatives of fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374, 20190094. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0094>
- Gleason, F.H., Carney, L.T., Lilje, O., Glockling, S.L., 2012. Ecological potentials of species of *Rozella* (*Cryptomycota*). *Fungal Ecology* 5, 651–656. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.003>
- Gleason, F.H., Lilje, O., Marano, A.V., Sime-Ngando, T., Sullivan, B.K., Kirchmair, M., Neuhauser, S., 2014. Ecological functions of zoosporic hyperparasites. *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00244>
- Grossart, H.-P., Wurzbacher, C., James, T.Y., Kagami, M., 2016. Discovery of dark matter fungi in aquatic ecosystems demands a reappraisal of the phylogeny and ecology of zoosporic fungi. *Fungal Ecology, Aquatic Fungi* 19, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.004>
- Haag, K.L., James, T.Y., Pombert, J.-F., Larsson, R., Schaer, T.M.M., Refardt, D., Ebert, D., 2014. Evolution of a morphological novelty occurred before genome compaction in a lineage of extreme parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 15480–15485.
- Han, B., Takvorian, P.M., Weiss, L.M., 2020. Invasion of Host Cells by *Microsporidia*. *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00172>
- Hasebe, A., Kanazawa, S., Takai, Y., 1984. Microbial biomass in paddy soil: I. Microbial biomass calculated from direct count using fluorescence microscope. *Soil Science and Plant Nutrition* 30, 175–187. <https://doi.org/10.1080/00380768.1984.10434681>

- Hawksworth, D.L., Lücking, R., 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
- James, T.Y., Berbee, M.L., 2012. No jacket required – new fungal lineage defies dress code. *BioEssays* 34, 94–102. <https://doi.org/10.1002/bies.201100110>
- James, T.Y., Pelin, A., Bonen, L., Ahrendt, S., Sain, D., Corradi, N., Stajich, J.E., 2013. Shared Signatures of Parasitism and Phylogenomics Unite *Cryptomycota* and *Microsporidia*. *Current Biology* 23, 1548–1553. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.057>
- Jones, M.D., Forn, I., Gadelha, C., Egan, M.J., Bass, D., Massana, R., Richards, T.A., 2011. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature* 474, 200–203.
- Kagami, M., Miki, T., Takimoto, G., 2014. Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Frontiers in Microbiology*. 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00166>
- Karpov, S., Mamkaeva, M.A., Aleoshin, V., Nassonova, E., Lilje, O., Gleason, F.H., 2014. Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (*Aphelidea*, *Opisthokonta*) and proposal for the new superphylum *Opisthosporidia*. *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00112>
- Karpov, S.A., Mikhailov, K.V., Mirzaeva, G.S., Mirabdullaev, I.M., Mamkaeva, K.A., Titova, N.N., Aleoshin, V.V., 2013. Obligately Phagotrophic *Aphelids* Turned out to Branch with the Earliest-diverging Fungi. *Protist* 164, 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2012.08.001>
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics* 20, 1160–1166.
- Keeling, P.J., Fast, N.M., 2002. *Microsporidia*: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology* 56, 93–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>
- Kerstens, H.M., Poddighe, P.J., Hanselaar, A.G., 1995. A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43, 347–352. <https://doi.org/10.1177/43.4.7897179>
- Kim, E., Harrison, J.W., Sudek, S., Jones, M.D.M., Wilcox, H.M., Richards, T.A., Worden, A.Z., Archibald, J.M., 2011. Newly identified and diverse plastid-bearing

- branch on the eukaryotic tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 1496–1500. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013337108>
- Kubota, K., 2013. CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes and environments* 28, 3–12.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* 35, 1547–1549.
- Letcher, P.M., Lopez, S., Schmieder, R., Lee, P.A., Behnke, C., Powell, M.J., McBride, R.C., 2013. Characterization of *Amoebophilidium protococcarum*, an Algal Parasite New to the *Cryptomycota* Isolated from an Outdoor Algal Pond Used for the Production of Biofuel. *PLOS ONE* 8, e56232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056232>
- Letcher, P.M., Powell, M.J., 2018. A taxonomic summary and revision of *Rozella* (*Cryptomycota*). *IMA Fungus* 9, 383–399. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2018.09.02.09>
- Liu, G., Amin, S., Okuhama, N.N., Liao, G., Mingle, L.A., 2006. A quantitative evaluation of peroxidase inhibitors for tyramide signal amplification mediated cytochemistry and histochemistry. *Histochemistry and Cell Biology* 126, 283–291. <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0161-x>
- Lücking, R., Aime, M.C., Robbertse, B., Miller, A.N., Aoki, T., Ariyawansa, H.A., Cardinali, G., Crous, P.W., Druzhinina, I.S., Geiser, D.M., Hawksworth, D.L., Hyde, K.D., Irinyi, L., Jeewon, R., Johnston, P.R., Kirk, P.M., Malosso, E., May, T.W., Meyer, W., Nilsson, H.R., Öpik, M., Robert, V., Stadler, M., Thines, M., Vu, D., Yurkov, A.M., Zhang, N., Schoch, C.L., 2021. Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nature Microbiology* 6, 540–548. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00888-x>
- Monchy, S., Sanciu, G., Jobard, M., Rasconi, S., Gerphagnon, M., Chabé, M., Cian, A., Meloni, D., Niquil, N., Christaki, U., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., 2011. Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing. *Environmental Microbiology* 13, 1433–1453. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02444.x>
- Nagahama, T., Takahashi, E., Nagano, Y., Abdel-Wahab, M.A., Miyazaki, M., 2011. Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in

- deep-sea methane cold-seep sediments. *Environmental Microbiology* 13, 2359–2370. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02507.x>
- Naranjo-Ortiz, M.A., Gabaldón, T., 2019. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 94, 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Neuenschwander, S.M., Salcher, M.M., Pernthaler, J., 2015. Fluorescence in situ hybridization and sequential catalyzed reporter deposition (2C-FISH) for the flow cytometric sorting of freshwater ultramicrobacteria. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00247>
- Piwoz, K., Mukherjee, I., Salcher, M.M., Grujčić, V., Šimek, K., 2021. CARD-FISH in the Sequencing Era: Opening a New Universe of Protistan Ecology. *Frontiers in Microbiology* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640066>
- Powell, M.J., 1984. Fine Structure of the Unwalled Thallus of *Rozella polyphagi* in Its Host *Polyphagus euglenae*. *Mycologia* 76, 1039–1048. <https://doi.org/10.2307/3793019>
- Powell, M.J., Letcher, P.M., 2019. Ultrastructure of early stages of *Rozella allomycis* (*Cryptomycota*) infection of its host, *Allomyces macrogynus* (*Blastocladiomycota*). *Fungal biology* 123, 109–116.
- Priest, T., Fuchs, B., Amann, R., Reich, M., 2021. Diversity and biomass dynamics of unicellular marine fungi during a spring phytoplankton bloom. *Environmental Microbiology* 23, 448–463. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15331>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35, 7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Rasconi, S., Jobard, M., Jouve, L., Sime-Ngando, T., 2009. Use of Calcofluor White for Detection, Identification, and Quantification of Phytoplanktonic Fungal Parasites. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2545–2553. <https://doi.org/10.1128/AEM.02211-08>
- Richards, T.A., Leonard, G., Mahé, F., del Campo, J., Romac, S., Jones, M.D.M., Maguire, F., Dunthorn, M., De Vargas, C., Massana, R., Chambouvet, A., 2015. Molecular diversity and distribution of marine fungi across 130 European environmental samples. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282, 20152243. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2243>

- Rudkin, G.T., Stollar, B.D., 1977. High resolution detection of DNA–RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 265, 472–473.
- Ruppert, K.M., Kline, R.J., Rahman, M.S., 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Schmidt, H., Eickhorst, T., Tippkötter, R., 2012. Evaluation of tyramide solutions for an improved detection and enumeration of single microbial cells in soil by CARD-FISH. *Journal of Microbiological Methods* 91, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.021>
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Consortium, F.B., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Tang, Y.Z., Dobbs, F.C., 2007. Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2306–2313.
- Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Drenkhan, R., Pritsch, K., Buegger, F., Padari, A., Hagh-Doust, N., Mikryukov, V., Gohar, D., Amiri, R., Hiiesalu, I., Lutter, R., Rosenvald, R., Rähn, E., Adamson, K., Drenkhan, T., Tullus, H., Jürimaa, K., Sibul, I., Otsing, E., Põlme, S., Metslaid, M., Loit, K., Agan, A., Puusepp, R., Varik, I., Kõljalg, U., Abarenkov, K., 2020. Regional-Scale In-Depth Analysis of Soil Fungal Diversity Reveals Strong pH and Plant Species Effects in Northern Europe. *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01953>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Puusepp, R., Nilsson, R.H., James, T.Y., 2017. Novel soil-inhabiting clades fill gaps in the fungal tree of life. *Microbiome* 5, 42. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0259-5>
- Tedersoo, L., Lindahl, B., 2016. Fungal identification biases in microbiome projects. *Environmental Microbiology Reports* 8, 774–779. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12438>
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., Abarenkov, K., 2018a. High-level classification of the Fungi

- and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity* 90, 135–159.
<https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>
- Tedersoo, L., Tooming-Klunderud, A., Anslan, S., 2018b. PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytologist* 217, 1370–1385. <https://doi.org/10.1111/nph.14776>
- Torruella, G., Grau-Bové, X., Moreira, D., Karpov, S.A., Burns, J.A., Sebé-Pedrós, A., Völcker, E., López-García, P., 2018. Global transcriptome analysis of the aphelid *Paraphelidium tribonemae* supports the phagotrophic origin of fungi. *Communications Biology* 1, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0235-z>
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D., 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis1. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46, 327–338.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Whittaker, R.H., 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163, 150–160.
- Williams, B.A.P., Hirt, R.P., Lucocq, J.M., Embley, T.M., 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418, 865–869.
<https://doi.org/10.1038/nature00949>
- Worley, A.C., Raper, K.B., Hohl, M., 1979. *Fonticula alba*: a new cellular slime mold (*Acrasiomycetes*). *Mycologia* 71, 746–760.
- Yilmaz, L.S., Bergsven, L.I., Noguera, D.R., 2008. Systematic evaluation of single mismatch stability predictors for fluorescence in situ hybridization. *Environmental microbiology* 10, 2872–2885.
- Yilmaz, L.S., Parnerkar, S., Noguera, D.R., 2011. mathFISH, a web tool that uses thermodynamics-based mathematical models for in silico evaluation of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1118–1122.

Viidatud veebilehed

1. OligoevaluatorTM. <http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet> (viimati vaadatud 23.05.2021).
2. Rappé (2013). https://hahana.soest.hawaii.edu/cmoreserver/summercourse/2013/documents/data2013/CARDFISH_rappe_2013.pdf. (viimati vaadatud 23.05.2021).
3. NCBI *nucleotide* geenipank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>. (viimati vaadatud 24.05.2021).

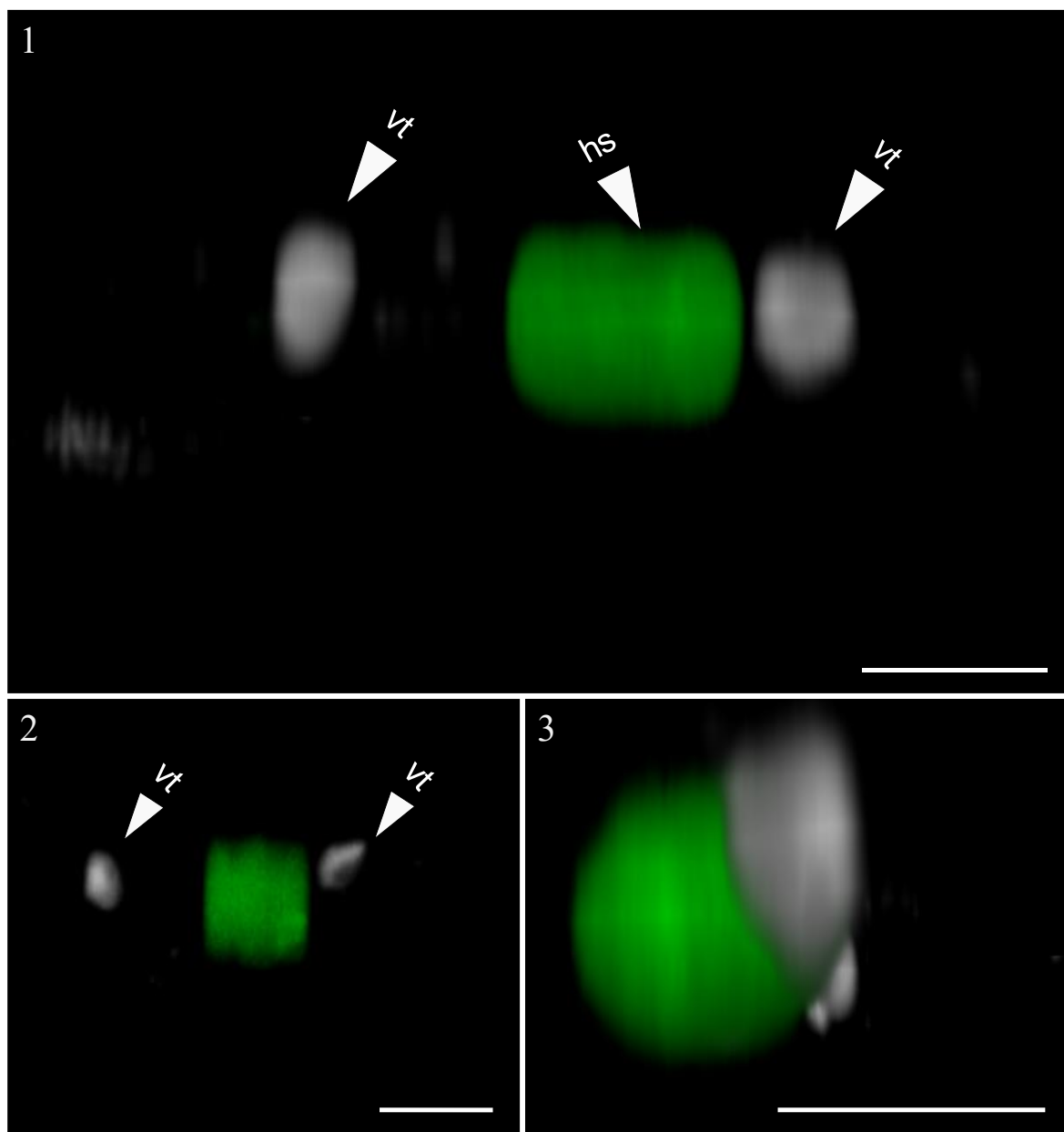
Lisad

Lisa 1. Kasutatud praimerid

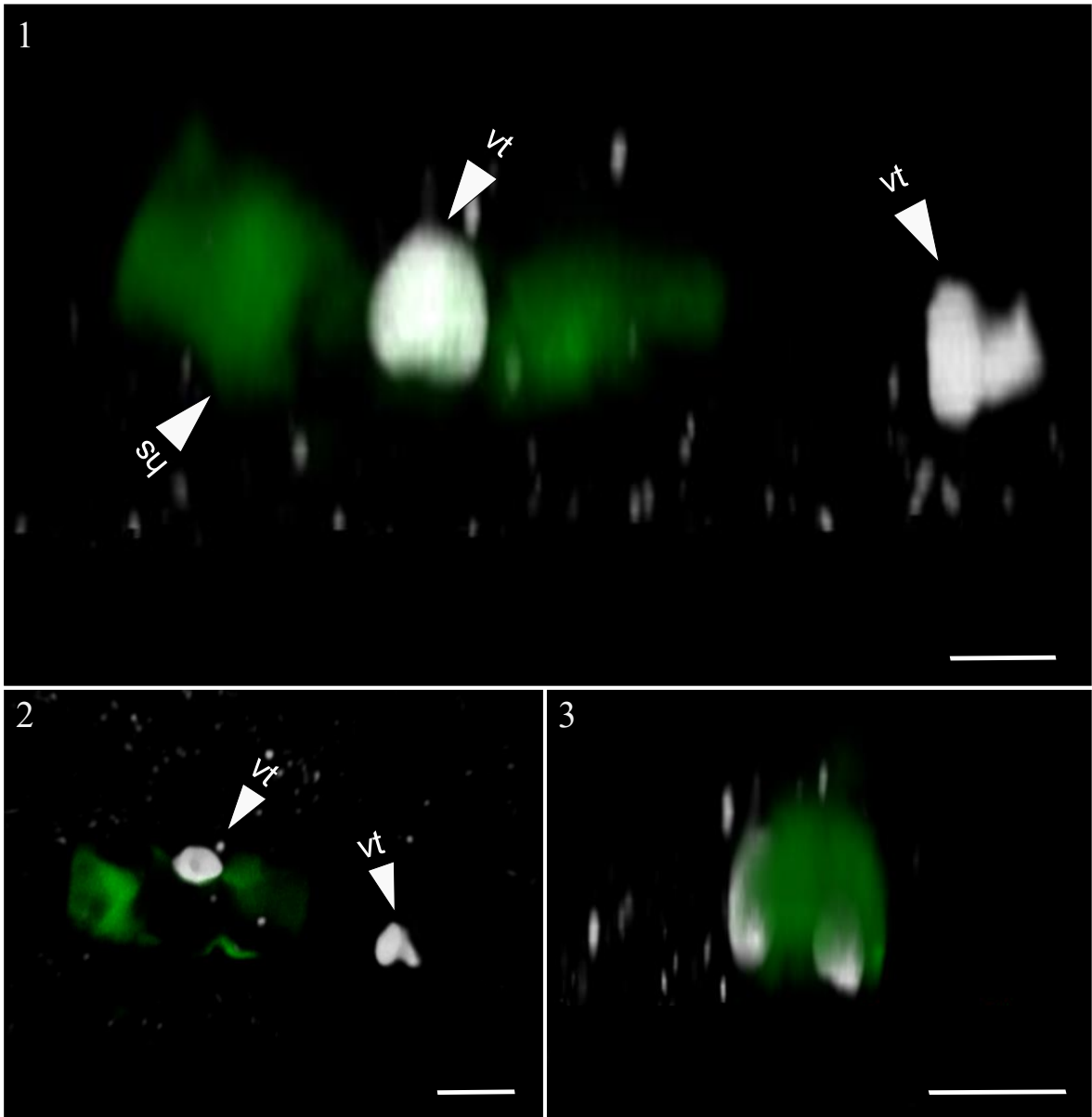
Tabel 1. Töös kasutatud praimerid, nende järjestused, sihtmärk ja viide. * on märgitud praimerid, mille 5' otsas on indeksjärjestus. Frw – päripidi praimer, rev – äraspidi praimer.

Praimeri nimi	5'→3' järjestused	Seondub	Viide
BCG2f (frw)	CTCAAGTTGGTACAGTAGTGG	BCG2 (<i>in silico</i>)	See töö
Euk895Rngs* (rev)	TCHNHGNATTTACACCNCT	Eukariöödid ja prokariöödid	Tedersoo avaldamata
CladeA SSUF (frw)	ACCGCCCGTCGCTRTTT	GS01 ja BCG2	Tedersoo <i>et al.</i> (2017)
ITS4ngsUni (rev)*	CCTSCSCTTANTDATATGC	Eukariöödid	Tedersoo ja Lindahl (2016)
Euk575F (frw)*	ASCYGYGGTAAWCCAGC	Eukariöödid	Tedersoo avaldamata
CladeA SSUR (rev)	CTAAGCCATYCAATCGGAAA	GS01 ja BCG2	Tedersoo <i>et al.</i> (2017)
ITS2cladeAseq (rev)	CGTTCTTCATMGTTTCGAG	GS01 ja BCG2	Tedersoo avaldamata
S515F*(frw)	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	Eukariöödid ja prokariöödid	Turner <i>et al.</i> (1999)

Lisa 2. Konfokaalmikroskoobi pildid võimalikust rakusisest interaktsioonist



Joonis 1. Konfokaalmikroskoobiga tehtud ruumiline pilt vetikast, mille üks rakk annab terve raku ulatuses Alexa Fluor 488 positiivse signaali. Roheline fluorestsents näitab Alexa Fluor 488 signaali; valge fluorestsents näitab DAPI positiivset signaali. 1 – külgvaade; 2 – pealtvaade; 3 – otsevaade. vt – vetika rakutuum; hs – Alexa fluor 488 signaal. Skaala 5 μm .



Joonis 2. Konfokaalmikroskoobiga tehtud ruumiline pilt vetikast, mille üks rakk annab ainult osaliselt Alexa Fluor 488 positiivset signaali. Roheline fluorestsents näitab Alexa Fluor 488 signaali; valge fluorestsents näitab DAPI positiivset signaali. 1 – külgsaade; 2 – pealtvaade; 3 – otsevaade. vt – vetika rakutuum; hs – Alexa fluor 488 signaal. Skaala 5 μm .

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mihkel Suija,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Varakult lahkenud seenerühma *Basal clone group 2* visualiseerimine CARD-FISH meetodikaga“, mille juhendaja on Leho Tedersoo,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Mihkel Suija
25.05.2021