

Vesikatku liikide geneetiline määramine

Töö teostati Eesti maaülikooli vesiviljeluse õppetooli kalageneetika laboris teadur Lilian Pukki poolt.

Väliste tunnuste põhjal on kahe vesikatku (väike vesikatku (*Elodea nuttallii*) ja Kanada vesikatku (*Elodea Canadensis*)) liigi eristamine äärmiselt keeruline. Seetõttu otsustati katsetada molekulaargeneetilist analüüsi nimega polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR (lühend inglise keelest *polymerase chain reaction*) ja selle tulemuse agarosgeeli peal visualiseerimist. PCR on meetod DNA järjestuse amplifikatsiooniks ehk kordistamiseks, mille käigus luuakse väga väikesest DNA lõigust miljoneid koopiaid. PCR meetodika võimaldab *in vitro* paljundada konkreetset DNA fragmenti, kasutades selleks termostabiilset DNA polümeraasi.

PCRi tegemiseks koguti väikese vesikatku tööruhna poolt erinevatest veekogudest üle Eesti 20 vesikatku proovi (Tabel 1). Geneetiliste markerite testimiseks eraldati kõikidest vesikatku proovidest DNA, kasutades selleks NucleoSpin Tissue (MACHEREYNAGEL) eralduskitti.

Tabel 1. Vesikatku proovide informatsioon ja geneetilise analüüsi (PCRi) tulemus.

Proovi nr.	Liik	Järv	Kogumise aeg	Märkused	PCRi tulemus
1	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Ihamaru Palojärv	29.06.22	lahtiselt vees	<i>Ei saa öelda</i>
2	<i>Elodea canadensis</i>	Käsmu	28.07.22	liigid koos?	<i>Ei saa öelda</i>
3	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Käsmu	28.07.22	liigid koos?	<i>Ei saa öelda</i>
4	<i>Elodea canadensis</i>	Alasjärv	5.08.22	liigid koos?	<i>Ei saa öelda</i>
5	<i>Elodea canadensis</i> ?	Beresje	13.08.22		<i>Ei saa öelda</i>
6	<i>Elodea canadensis</i>	Öökulli pj.	17.09.14		<i>Ei saa öelda</i>
7	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Uhtjärv	30.06.22	liigid koos?	<i>Ei saa öelda</i>
8	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Martiska	27.06.22		<i>Ei saa öelda</i>
9	<i>Elodea canadensis</i>	Kauru	29.06.22		<i>Ei saa öelda</i>
10	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Kauru	29.06.22		<i>Ei saa öelda</i>
11	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Purgatsi	6.08.22		<i>Ei saa öelda</i>
12	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Nikerjärv	6.08.22		<i>Ei saa öelda</i>
13	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Urbukse	6.08.22		<i>Ei saa öelda</i>
14	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Udsu	29.07.22		<i>Ei saa öelda</i>
15	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Alasjärv	5.08.22	liigid koos?	<i>Ei saa öelda</i>
16	<i>Elodea nuttallii</i> ?	Vihtla	5.08.22		<i>Ei saa öelda</i>
17	<i>Elodea canadensis</i>	Pühajärv	13.08.22		<i>Ei saa öelda</i>
18	<i>Elodea canadensis</i>	Udriku	6.08.22		<i>Ei saa öelda</i>
19	<i>Elodea canadensis</i>	Veisjärv	7.08.22		<i>Ei saa öelda</i>
20	<i>Elodea canadensis</i>	Uhtjärv	30.06.22	liigid koos?	<i>Ei saa öelda</i>

2022. aasta lõpus teostatud ulatusliku kirjanduse läbitöötamise tulemusena otsustati tellida kaks geneetilist markerit väikese ja Kanada vesikatku identifitseerimiseks.

Markerite informatsioon:

Väike vesikatku (*Elodea nuttallii*)

(Gantz, Renshaw, Erickson, Lodge, & Egan, 2018)

Enut ITS1 1Fb: 5' - GCGTTGCTCTATTTGGAT - 3'

Enut ITS1 1Rb: 5' - GAGCAGCCCTTCAAGGCAACA - 3'

Tegemist on 122 aluspaari pikkuse fragmendiga.

Kanada vesikatku (*Elodea Canadensis*)

(Anglès d'Auriac, Strand, Mjelde, Demars, & Thaulow, 2019)

EctrnL_F: 5' - TTTCTCCTTCATTGTATTCTTTCACA - 3'

EctrnL_R: 5' - TGTTGATTTCTATCTGTATTGTAGAC - 3'

Tegemist on 103 aluspaari pikkuse fragmendiga.

Mõlema artikli autorid ei testinud väljatöötatud markerite liigispetsiifilisust. Ehk siis Gantz et al. (2018) ei testinud oma markerit Kanada vesikatu proovidega ning d'Auriac et al. (2019) ei testinud oma markerit väikese vesikatu proovidega. See tähendab, et enne PCRi tegemist ei olnud teada, kas marker amplifitseerib ka teise vesikatku liigi DNAd. Samuti õnnestus meil testimiseks Läti botaaniku Laura Grinbergi käest saada väikese vesikatku proovid (Joonis 1).

Kahjuks on molekulaargeneetilise analüüsi tulemus see, et me ei saa öelda, millise liigiga on tegemist, kuna mõlemad markerid amplifitseerusid sama hästi mõlema liigi DNAGA (Joonis 2 ja 3). Joonistel 2 ja 3 numbrite all olev hele joon tähistab õnnestunud PCRi, mille käigus amplifitseerus DNA fragment (PCR NEG all hele joon puudub, kuna proovis puudub DNA). See aga tähendab, et me ei saa väita, et väike vesikatku Eesti veekogudes on olemas või puudub.

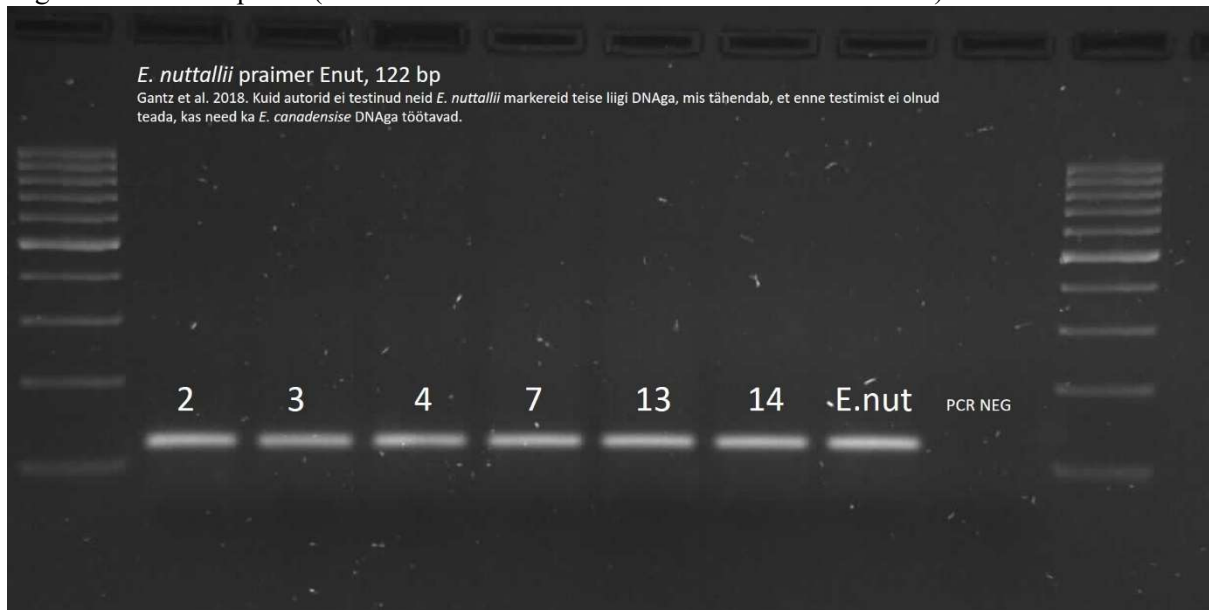
Kuna morfoloogiliste tunnuste põhjal seda liiki käesoleva projekti raames läbi viidud uuringute põhjal ei tuvastatud ega kinnitanud ka geneetilised analüüsid, oleks täpsema tuvastamise jaoks vaja läbi viia põhjalikumad geneetilised uuringud (näiteks Sanger sekveneerimine ja sellele järgnev bioinformaatiline andmeanalüüs), mis nõuavad suuremat aja- ja tööjõukulu ning spetsiifilisi oskusi, mida ei olnud käesoleva projekti raames võimalik teostada.

Joonised.

Joonis 1. Väikese vesikatku (*Elodea nuttallii*) kuivatatud proovid.



Joonis 2. Väikese vesikatku markerite PCRi tulemus valitud proovidega. Numbrid tähistavad Tabel 1 proove, E.nut on Lätist saadud väikese vesikatku proov ning PCR NEG on PCRi tegemisel kasutatud negatiivne kontroll proov (DNA asemel kasutati reaktsioonis destilleeritud vett).



Joonis 3. Kanada vesikatku markerite PCRi tulemus valitud proovidega. Numbrid tähistavad Tabel 1 proove, E.nut on Lätist saadud väikese vesikatku proov ning PCR NEG on PCRi tegemisel kasutatud negatiivne kontroll proov (DNA asemel kasutati reaktsioonis destilleeritud vett).



Kasutatud kirjandus

- Anglès d'Auriac, M. B., Strand, D. A., Mjelde, M., Demars, B. O. L., & Thaulow, J. (2019). Detection of an invasive aquatic plant in natural water bodies using environmental DNA. *PLOS ONE*, *14*(7), e0219700.
- Gantz, C. A., Renshaw, M. A., Erickson, D., Lodge, D. M., & Egan, S. P. (2018). Environmental DNA detection of aquatic invasive plants in lab mesocosm and natural field conditions. *20*(9), 2535-2552.