



# FORSKNINGSRAPPORT FRÅN SVENSKA ARTPROJEKTET

## Projektperiod: 2002–2003

Göran Thor  
Sveriges lantbruksuniversitet (SLU)

---

LAVAR:

## Taxonomi och fylogeni hos lavsläktet *Fuscidea*

### Material

Herbariematerial lånades in från följande officiella herbarier B, BG, BM, C, CANB, CANL, COLO, GZU, HO, LD, NY, O, PRE, TNS, TU, UPS och US samt följande privatherbarier A. Aptroot (Nederländerna), F. Jonsson (Sverige), P. May (USA), Björn Owe-Larsson (Sverige) och M. Zhurbenko (St. Petersburg).

Endast två egna insamlingsresor gjordes, en till nedre Dalälven där färskt material av *Fuscidea austera* insamlades och en till Knivstatrakten, Uppland där färskt material av *Fuscidea cyathoides*, *F. praeurptorum*, *F. recensa* och *Ropalospora atroumbrina* insamlades.

I samband med exkursioner med andra huvudsyften insamlades material av *Fuscidea cyathoides*, *F. pusilla* och *Ropalospora viridis*. Detta ledde till att vi hade rikligt med färskt material från släktets hela utbredningsområde att sekvensera.

### Metoder

Vi har arbetat med sekvenser av det nukleära ribosomala DNA:t för att söka kunskap om fylogenin hos de arter vi studerat. För att kunna sekvensera dessa har vi först amplifierat DNA med hjälp av PCR (Polymerase Chain Reaction). Mer specifikt har vi arbetat med den lilla subenheten i det ribosomala DNA:t eftersom sekvenserna i den regionen är mycket konservativa och används för att testa hypoteser om släktskap på hög fylogenetisk nivå som familjer och ordningar. Denna region omfattar ca 1 800 baspar DNA, varför amplifiering och sekvensering måste pusslas ihop i flera steg med flera olika primerpar. Amplifiering och sekvensering har gjorts med hjälp av ABI och Beckmans teknikplattformar och här har speciellt sekvensering i multipla kapillärer gjort att arbetet kunnat fortskrida mycket snabbt.

Inom projektet har vi under endast två månaders laborationstid extraherat DNA från 48 kollektioner, amplifierat DNA från alla kollektioner samt genererat ca 250 sekvenser. Under

arbetets gång gjorde vi den intressanta upptäckten att vi fann dubbla ribosomer inom vissa linjer i vårt material (se nedan).

För att ytterligare kunna studera detta intressanta fenomen och för att få fram läsbara sekvenser från dessa kollektioner har ett femtiotal kloningar av PCR-produkter gjorts. För dessa prover har vi varit tvungna att klonera in PCR-produkten i en bakterievektor. Bakterien har sedan odlats upp i olika koncentrationer och de kolonier där PCR-produkten klonats in sekvenseras senare i ett ytterligare steg. Det är med andra ord en tidskrävande men effektiv metod att isolera olika varianter även gen.

Dessa har givit ett gott resultat och vi har nu fina sekvenser från 48 kollektioner insamlade enligt ovan liksom en god bild av intranukleära polymorfismer i det nukleära ribosomala DNA:t.

Sekvenserna har editerats och alignats i programmen bioEdit och CLUSTAL-W. Alignments har sedan justeras manuellt innan fylogenetiska analyser gjorts.

De fylogenetiska analyserna är utförda i programmet PAUP. Våra data har analyserats med både hjälp av distans- och maximum parsimony-metoder. Resulten har utvärderats med hjälp av 2000 bootstrap och/eller jackknife upprepningar för att testa de träd som analyserna givit. Specifika hypoteser har utvärderats med Kishino-Hasegawa testet.

## Resultat

### A. *Multiplex* genom

I vårt initiala arbete erhöj vi sekvenser av mycket dålig kvalitet inom släktet *Fuscidea*. Då vi arbetade vidare med detta problem, som vi först trodde berodde på ospecifik amplifiering av DNA:t, fann vi att olika primerpar gav delvis olika sekvenser. Detta tydde på att genomet inom släktet *Fuscidea* kunde innehålla multiplex kopior av det ribosomala DNA:t. Det innebär för vårt forskningsprojekt både problem och möjligheter.

Å ena sidan så innebär intranukleär polymorfism av det nukleära DNA:t att sekvenseringen allvarligt försvåras. Å andra sidan innebär det en spännande upptäckt, eftersom fenomenet tidigare endast är känt hos fiskar och plattmaskar. Tidigare är endast längdvariation inom introner känt hos licheniserade svampar.

Kloning av PCR-produkter konfirmerade att släktet *Fuscidea* har dubbelt ribosomalt DNA och att varianterna skiljer sig markant från varandra. Vi kan utesluta lavparasiter som ursprung till de dubbla sekvenserna eftersom de förekommer konsekvent i alla kollektioner över olika vitt spridda kontinenter. Sekvenserna matchar heller inte kända lavparasiter vid sökningar i GenBank. Ursprunget till variationen kan vara genomduplikation eller hybridisering tidigt under evolutionen.

### B. Vilken ordning tillhör *Fuscideaceae*?

*Fuscideaceae* förs för närvarande till Lecanorales, Telochistineae. Våra resultat, grundade på SSU rDNA sekvenser av 19 kollektioner från släktena *Fuscidea*, *Maronea*, *Orphniospora* och *Ropalospora*, visar klart att *Fuscideaceae* s. str. (*Fuscidea*, *Maronea*, *Ropalospora*) definitivt inte hör till Lecanorales. Vi har emellertid ännu inte hittat någon beskriven ordning vilken familjen istället skulle kunna föras till.

#### C. Monofylin hos Fuscideaceae

Fuscideaceae har traditionellt omfattat *Fuscidea*, *Lettauia*, *Maronea*, *Orphniospora*, *Ropalospora* och *Sarrameana*. *Sarrameana* avfördes för några år sedan från denna familj, och av *Lettauia* hade vi inte något färskt material att sekvensera. Våra resultat visar att av övriga släkten hör inte *Orphniospora* (baserat på en av de tre arterna i släktet) till Fuscideaceae utan är istället närmast släkt med kladen *Xanthoria/Caloplaca* inom Lecanorales.

#### D. Monofylin hos Fuscidea och Ropalospora

I litteraturen har uppdelningen i *Fuscidea* och *Ropalospora* ibland ifrågasatts. Våra resultat visar dock att de är klart skilda åt och att *Ropalospora* i sin nuvarande avgränsning är monofyletiskt. *Fuscidea* är dock i sin nuvarande avgränsning är polyfyletiskt och skall enligt våra data sannolikt delas upp i två släkten.

#### E. Morfologisk taxonomi

Någon fullständig revision av herbariematerialet baserat på morfologiska karaktärer har inte slutförts, men en preliminär snabbrevision har lett till upptäckten av en obeskriven *Ropalospora*-art från Uralbergen och en obeskriven barkväxande *Fuscidea*-art från Hokkaido (Japan). Eftersom de flesta av arterna inom familjen har vida utbredningar på det norra halvklotet är säkerligen utbredningen för dessa arter större än vad de nuvarande kollektionerna indikerar.

Våra resultat indikerar också att taxonomin och nomenklaturen för några av de från Sverige rapporterade arterna är mycket oklar, t ex *Fuscidea asyndeta*, och att en revision av de svenska arterna skulle medföra stora förändringar vad avser de i Sverige förekommande arternas antal och nomenklatur.

#### F. Arternas frekvens i Sverige

Resultaten indikerar att flera av arterna, endast rapporterade från ett fåtal lokaler, i själva verket är förbisedda och vanliga. Andra arter, speciellt vissa suboceaniska arter med förekomst i Sydvästsverige, har sannolikt minskat kraftigt och bör eventuellt rödlistas.

---

#### PUBLIKATION

Bylin, A., Arnerup, J., Högberg, N. & Thor, G. 2007. A phylogenetic study of Fuscideaceae using mtSSU rDNA. *Bibliotheca Lichenologica* 96: 49–60.

Rapport granskad och godkänd: 2016-02-10