



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Margus Voode

**MÕNEDE EESTI HERNESKARPIDE (*BIVALVIA:*
SPHAERIIDAE: PISIDIUM SPP.) SÜSTEMAATIKAST**

ON THE SYSTEMATICS OF SOME ESTONIAN PEA CLAMS
(*BIVALVIA: SPHAERIIDAE: PISIDIUM* SPP.)

Magistritöö
Vee- ja maismaa ökosüsteemide rakendusbioloogia õppekava

Juhendaja: vanemteadur Tarmo Timm, bioloogiadoktor

Tartu 2017

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Magistritöö lühikokkuvõte	
Autor: Margus Voode		Õppekava: Vee ja maismaa ökosüsteemide rakendusbioloogia	
Pealkiri: „Mõnede Eesti herneskarpid (<i>Bivalvia: Sphaeriidae: Pisidium</i> spp.) süstemaatikast“			
Lehekülgi:49	Jooniseid: 10	Tabeleid: 5	Lisasid: –
<p>Osakond: Limnoloogia Uurimisvaldkond: Bio- ja keskkonnateadused 1.4. Ökoloogia, biosüstemaatika ja -füsioloogia Juhendaja(d): Tarmo Timm, bioloogiadoktor Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu, 2017</p>			
<p>Herneskarbid (<i>Bivalvia: Sphaeriidae: Pisidium</i> spp.) on suure morfoloogilise varieeruvusega, mistõttu on kirjeldatud palju liike, vorme ja varieteete, millest paljusid on hiljem käsitletud sünonüümidenä. Ühed morfoloogiliselt kõige rohkem varieeruvad liigid on <i>Pisidium casertanum</i> (Poli, 1791) ja <i>P. nitidum</i> Jenyns, 1832. Nende liikide tuntuimad vormid on <i>P. casertanum</i> f. <i>ponderosa</i> Stelfox, 1918 ja <i>P. nitidum</i> f. <i>crassa</i> Stelfox, 1918. Neid vorme on mitmed autorid käsitletud ka iseseisvate liikidenä.</p> <p>Käesoleva töö eesmärk on selgitada, kas <i>P. casertanum</i> ja <i>P. casertanum</i> f. <i>ponderosa</i> ning <i>P. nitidum</i> ja <i>P. nitidum</i> f. <i>crassa</i> on erinevad liigid. Selleks on võrreldud nende vormide morfomeetrilisi andmeid, koja frontaallõike väliskontuure ja COI geeni. Morfomeetrilise analüüsi tulemusena selgus, et liigi <i>P. casertanum</i> tüüpilise vormi ja vormi <i>ponderosa</i> vahel erinesid enamus uuritud koja indekseid statistiliselt oluliselt. Kojä väliskontuurides ei olnud nende vormide vahel erinevusi, seega ei saa väliskontuure võrdlevat meetodit kasutada nende vormide eristamiseks. DNA sekveneerimine õnnestus liigi <i>P. casertanum</i> vormi <i>ponderosa</i> puhul, kuid ei õnnestunud tüüpilise vormi puhul. Liigi <i>P. casertanum</i> vormi <i>ponderosa</i> geenijärjestused ei erine oluliselt GenBank'is olevatest tüüpilise vormi järjestustest, mistõttu ei saa vormi <i>ponderosa</i> pidada iseseisvaks liigiks. Liigi <i>P. nitidum</i> tüüpilise vormi ja vormi <i>crassa</i> vahel erinesid kõik morfomeetrilised indeksid statistiliselt oluliselt. Samuti erinesid mõlema vormi koja väliskontuurid üksteisest, seega on võimalik</p>			

väliskontuuri kasutada nende vormide eristamisel ühe määramistunnusena. DNA sekveneerimine õnnestus liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi puhul, kuid mitte vormi *crassa* puhul. Seetõttu ei saa vormi *crassa* geneetilist iseseisvust kinnitada.

Märksõnad: süstemaatika, herneskarbid, geneetika

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Margus Voode		Speciality: Applied Biology of Aquatic and Terrestrial Ecosystems	
Title: „On the systematics of some Estonian pea clams (<i>Bivalvia: Sphaeriidae: Pisidium</i> spp.)“			
Pages: 49	Figures: 10	Tables: 5	Appendixes: –
Department: Limnology Field of research: Biosciences and Environment 1.4 Ecology, Biosystematics and -physiology Supervisors: biol. dr. Tarmo Timm Place and date: Tartu, 2017			
<p>Pea clams (<i>Bivalvia: Sphaeriidae: Pisidium</i> spp.) are morphologically highly variable, therefore there are described many species, forms and varieties, many of which are later considered as synonymes. Amongst the most variable species are <i>Pisidium casertanum</i> (Poli, 1791) and <i>P. nitidum</i> Jenyns, 1832. Their most known forms are <i>P. casertanum</i> f. <i>ponderosa</i> Stelfox, 1918 and <i>P. nitidum</i> f. <i>crassa</i> Stelfox, 1918. These forms have also been considered as separate species by many authors. The aim of the current study was to clarify if forms <i>ponderosa</i> and <i>crassa</i> are independent species. In this purpose I compared shell morphometrical data, shell frontal section contour and COI gene. According to the morphometrical analyses, <i>P. casertanum</i> differs from <i>P. casertanum</i> f. <i>ponderosa</i> by most of the studied shell indices. The shell frontal section contour did not differ between these two forms, therefore the method of comparing shell frontal section contour cannot be used to distinguish them. DNA sequencing was successful for the form <i>ponderosa</i> but not for the typical form of <i>P. casertanum</i>. COI gene sequences of the form <i>ponderosa</i> did not differ significantly from the sequences of the typical form obtained from GenBank. Therefore <i>P. casertanum</i> f. <i>ponderosa</i> cannot be considered as independent species.</p>			

Pisidium nitidum and *P. nitidum* f. *crassa* differed statistically significantly by all studied shell indices. The shell frontal section contour was different between *P. nitidum* and *P. nitidum* f. *crassa*. Therefore this contour can be used as a characteristic for distinguishing these two forms. The sequencing was successful only for the typical form of *P. nitidum*. Consequently the genetic independence *P. nitidum* f. *crassa* cannot be confirmed.

Keywords: systematics, pea clams, genetics

SISUKORD

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1. Herneskarpide süstemaatikast.....	9
1.2. <i>Pisidium casertanum</i> (Poli, 1791)	10
1.3. <i>Pisidium casertanum</i> f. <i>ponderosa</i> Stelfox, 1918.....	13
1.4. <i>Pisidium nitidum</i> Jenyns, 1832	15
1.5. <i>Pisidium nitidum</i> f. <i>crassa</i> Stelfox, 1918.....	17
2. MATERJAL JA MEETODID.....	20
2.1. Proovide kogumise aeg ja koht.....	20
2.2. Morfoloogilised analüüsid.....	20
2.2.1. Koja mõõtmed ja frontaallõike (otsavaate) väliskontuur.....	20
2.2.2. Statistilised analüüsid.....	21
2.3. DNA analüüsid.....	21
3. TULEMUSED.....	25
3.1. Morfoloogilised analüüsid.....	25
3.1.1. Koja mõõtmed.....	25
3.1.2. Diskriminantanalüüs.....	30
3.1.3. Koja frontaallõike väliskontuur.....	33
3.2. DNA analüüsid.....	34
4. ARUTELU.....	36
4.1. Koja morfoloogia.....	36
4.2. Geneetilised analüüsid.....	37
KOKKUVÕTE.....	39
ON THE SYSTEMATICS OF SOME ESTONIAN PEA CLAMS (<i>BIVALVIA</i> : <i>SPHAERIIDAE</i> : <i>PISIDIUM</i> SPP.)	48

SISSEJUHATUS

Herneskarbid (*Pisidium* spp.) on mageveekogude põhjasetetes elavad ühed kõige laiemal levikuga limused (Guralnick 2005). Magevees elavatest limustest on nad ühed väikseimad, pikkusega kuni 11 mm (Glöer, Meier-Brook 2003). Nad on mõlemasoolised ja eluspoegijad, järglased arenevad sisemises lõpuslehes olevas haudetaskus (Heard 1965). Herneskarbid domineerivad sageli zoobentose kooslustes (Корнюшин 1996) ning nende arvukus võib ulatuda kuni 130 000 is/m² (Dyduch-Falniowska 1982). Herneskarpidel on tähtis roll veekogude ökosüsteemides – nad vabastavad setete segustamise teel setetest toiteaineid ja rikastavad seda hapnikuga (Алимов 1981; Vaughn, Hakenkamp 2001) ning on oluliseks toiduobjektiks kaladele (Økland, Kuiper 1982). Mõned herneskarpide liigid on tundlikud kahjulike ainete akumulatsioonile ja veekogu madala hapnikusisalduse suhtes ning on seetõttu väärtuslikud bioindikaatorid (Horsák 2006).

Herneskarpide süstemaatikas liigi ja kõrgemate taksonite tasandil ei ole siiani saavutatud üksmeelt (Korniuszin, Glaubrecht 2002). Kõige suuremad erinevused on Euroopa ja Venemaa malakoloogiliste koolkondade vahel, see on põhjustatud erinevast liigikäsitlusest ja määramismeetodist (Корнюшин 1996). Euroopas käsitletakse herneskarpe enamasti ühe perekonnana *Pisidium* Pfeiffer, 1821, mis kuulub koos keraskarpidega (*Sphaerium* spp., *Musculium* spp.) sugukonda *Sphaeriidae* Deshayes, 1855 (1820) (Glöer, Meier-Brook 2003; Killeen et al. 2004). Venemaal tunnustatud süsteemis on herneskarpide liikide arv palju suurem ning need on tavaliselt paigutatud eraldi sugukondadesse *Pisidiidae* Gray in Turton, 1857 ja *Euglesidae* Pirogov et Starobogatov, 1974 (Старобогатов и др. 2004). Viimases süsteemis kasutatakse liikide määramisviisina lukuhammade kuju ja koja frontaallõike (otsavaate) väliskontuuri kui logaritmilise kasvukõvera graafilist võrdlemist (Логвиненко, Старобогатов 1971). Selle süsteemi alusel on põhjalikult uuritud ka Eesti herneskarpide faunat (Timm 1975, 1976).

Üldtunnustatud süsteemi puudumise tõttu on käesolevas töös järgitud Lääne-Euroopa ja Põhja-Ameerika autorite poolt kasutatud molekulaargeneetilistel tunnustel põhinevat süsteemi, mille järgi käsitletakse herneskarpe ühe perekonnana *Pisidium*, mis on jagatud

neljaks alamperekonaks: *Pisidium* s.str. Pfeiffer, 1821; *Cyclocalyx* Dall, 1903; *Afropisidium* Kuiper, 1962 ja *Odhneripisidium* Kuiper, 1962 (Lee, Ó Foighil 2003; Schultheiß et al. 2008; Clewing et al. 2013).

Herneskarpidede koja suure morfoloogilise varieeruvuse tõttu on kirjeldatud palju liike, vorme ja varieteete, millest paljusid on hiljem käsitletud sünonüümidenä (Kennard, Woodward 1926). Ühed morfoloogiliselt kõige rohkem varieeruvad liigid on *P. casertanum* (Poli, 1791) ja *P. nitidum* Jenyns, 1832 (Piechocki 1989). Nende liikide tuntuimad vormid on *P. casertanum* f. *ponderosa* Stelfox, 1918 ja *P. nitidum* f. *crassa* Stelfox, 1918, mis erinevad tüüpilistest vormidest kõrgema ja paksema koja poolest (Stelfox 1918). Neid vorme on käsitletud ka erinevate liikidenä (Timm 1975; Старобогатов 1977). Kirjanduses on varem korduvalt rõhutatud vajadust uurida nende vormide geneetilist erinevust tüüpilistest liikidenä, et teha kindlaks, kas need on tõepoolest erinevad liigid (Корнюшин 2002; Korniushev 2004). Herneskarpidede liigilise staatuse kindlakstegemine võimaldab neid paremini kasutada veekogude seires indikaatoritenä.

Käesoleva töö autor on varem morfoloogiliselt ja geneetiliselt analüüsinud Vene määramismeetodi järgi eristatud liike *P. amnicum* (Müller, 1774) ja *P. inflatum* Megerle in Porro, 1838 (Voode 2017). Uuringu tulemusena selgus, et need liigid on geneetiliselt eristamatud ja morfoloogilistes tunnustes esineb lisaks kahe tüüpilise liigi isenditenä ka vahepealseid vorme, seetõttu tuleks liiki *P. inflatum* pidada liigi *P. amnicum* ökoloogiliseks vormiks (Voode 2017).

Käesoleva töö eesmärk on selgitada, kas *P. casertanum* ja *P. casertanum* f. *ponderosa* ning *P. nitidum* ja *P. nitidum* f. *crassa* on erinevad liigid. Selleks on võrreldud nende vormide morfomeetrilisi andmeid, koja frontaallõike väliskontuure ja COI geeni. Hüpoteesid: *P. casertanum* ja *P. casertanum* f. *ponderosa* ning *P. nitidum* ja *P. nitidum* f. *crassa* 1) erinevad üksteisest morfomeetriliselt, 2) erinevad koja frontaallõike väliskontuurilt ja 3) on COI geeni alusel erinevad liigid.

Töö autor tänab juhendajat Tarmo Timmi ja Katrin Kaldmat Maailikooli zoologia osakonnast, kes aitas geneetiliste analüüside läbiviimisel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Herneskarpide süstemaatikast

Herneskarpide suur morfoloogiline varieeruvus on viinud paljude, hiljem sünonüümideks peetud liikide kirjeldamiseni (Kennard, Woodward 1926; Kuiper 1983). Uute herneskarpi liikide kirjeldamine hoogustus 19. sajandi lõpul: S. Clessin (1879) nimetas oma töös 57 liiki herneskarpe, C. A. Westerlund (1890) 64 liiki ja F. Paetel (1890) 112 liiki. B. B. Woodward (1913) luges paljud varem kirjeldatud liigid sünonüümideks ning vähendas herneskarpi liikide arvu 16-ni. 1970-ndate alguses Venemaal toimunud limuste süstemaatika revisjoni käigus kasvas liikide arv jälle kiiresti (Пирогов, Старобогатов 1974). Taastati suur hulk liike, mida varem oli peetud sünonüümideks (Пирогов, Старобогатов 1974). See oli seotud karpide koja frontaallõike väliskontuuri võrdleva meetodi kasutuselevõtuga liikide määramisel (Логвиненко, Старобогатов 1971; Shikov, Zatravkin 1991). Kui Lääne-Euroopa autorid eristavad Euroopas 18–24 liiki herneskarpe (Kuiper 1993; Adler 1994), siis võrdleva meetodi abil eristatud liike on seal 79–83 (Старобогатов и др. 2004; Кантор, Сысоев 2005).

Koja frontaallõike väliskontuuri võrdleva meetodi puhul kasutatakse karpide liikide eristamisel koja väliskuju otsvaates, mida võrreldakse standardkontuuridega (Логвиненко, Старобогатов 1971; Shikov, Zatravkin 1991). Selle meetodi kasutamisel põhinevas süsteemis on tihti iga traditsiooniline liik saanud omaette perekonnaks (Пирогов, Старобогатов 1974) või koguni alamperekonnaks (Старобогатов и др. 2004). Sellist liikide määramise meetodit on mitmed autorid kritiseerinud, kuna see ei vasta bioloogilisele liigikontseptsioonile (Graf 2007) ning meetodi kasutamisel esineb subjektiivne moment (Корнюшин 2002). Isegi väike ebatäpsus kontuuride algpunkti asetuses põhjustab suuri erinevusi kontuuride kokkusobivuses (Корнюшин 2002; Богатов 2014). Mõnede ebaräplikarpide ja keraskarpide liikide puhul on näidatud, et koja väliskontuur ei vasta alati logaritmilisele spiraalile ning selle spiraali polaarnurga väärtused

kattuvad erinevatel liikidel (Voroshilova 2013). Samas on leitud varem ainult võrdleva meetodi abil eristatud liikidel *Pisidium globulare* Clessin in Westerlund, 1873 ja *Sphaerium nucleus* (Studer, 1820) erinevusi traditsioonilistest liikidest ka siseelundite anatoomilistes tunnustes (Корнюшин 1996). Sugukonna *Unionidae* Fleming, 1828 (jõekarplased) liikidel *Cristaria herculea* (Middendorff, 1847) ja *C. tuberculata* Schumacher, 1817, mida on eristatud koja väliskontuuri alusel, on avastatud erinevusi ka glohhiidide (vastsete) morfoloogilistes tunnustes, mis võib näidata nende liigilist eraldatust (Затравкин, Богатов 1987; Sayenko et al. 2005).

Eestis on Ja. I. Starobogatovi eeskujul kasutanud seda määramismeetodit Viivi Timm, kes käsitles herneskarpe sugukonnana *Pisidiidae* Gray in Turton, 1857, mis sisaldas kolme perekonda: *Pisidium* Pfeiffer, 1821, *Euglesa* Leach in Jenyns, 1832 ja *Neopisidium* Odhner, 1921 (Timm 1975, 1976). Ta leidis Eesti sisevetest 38 liiki herneskarpe (Тимм 1979; Тимм 1984; Timm et al. 1994), neist 4 teadusele uut: *Euglesa ruut* Timm, 1975; *E. tanuga* Timm, 1975; *E. pihkva* Timm, 1976 ja *E. peipsi* Timm, 1976 (Timm 1975, 1976). Kaks neist (*P. amnicum* ja *P. inflatum*) on tõestatud ühe liigi, *P. amnicum*, ökoloogilised vormid (Voode 2017).

Molekulaargeneetilised uuringud on näidanud, et liikidele arv võib olla siiski suurem kui praegu Lääne-Euroopas ja Põhja-Ameerikas tunnustatakse, kuna on leitud herneskarpe, kes on morfoloogiliselt sarnased tuntud liikidele, kuid on geneetiliselt erinevad (Lee, Ó Foighil 2003; Guralnick 2005).

1.2. *Pisidium casertanum* (Poli, 1791)

Liik *Pisidium casertanum* (Poli, 1791) on herneskarpide seas mõõtmetelt üks suurimaid, selle pikkus võib olla kuni 6,5 mm, kõrgus 5,5 mm ja laius 4 mm (Piechocki 1989). Koda on valge või hallikas-pruun, tihedate kontsentriliste triipudega (Killeen et al. 2004) (joonis 1). See on herneskarpidest ainus kosmopoliitne liik (Kuiper 1983), kuid troopilistel aladel esineb teda ainult mägedes asuvates veekogudes (Kuiper et al. 1989). Põhja-Euroopas on ta herneskarpidest levinuim (Kuiper et al. 1989). Elupaigaks on peamiselt pisiveekogud, kuid

esineb ka järvedes, jõgedes on teda vähesel arvul (Meier-Brook 1975). Esineb kuni 2500 m kõrgusel Alpides (Germain 1930), Lõuna-Ameerikas on teda leitud kuni 3600 m kõrguselt (Kuiper, Wolf 1970), Aafrikas Ruwenzori mäestikus kuni 3790 m kõrguselt üle merepinna (Kuiper 1972). Eestis on tema leidumist metsalompides nimetanud Curt Krausp (1936). Viivi Timm ei leidnud Eestist tüüpilist liiki *P. casertanum*, küll aga mitmeid vorme, mis võivad olla ka selle liigi sünonüümid (Timm 1975, 1976)



Joonis 1 . Liigi *Pisidium casertanum* tüüpilise vormi koda külgvaates. Püütud Saadjärvest. Mõõteskaala – 1 mm

Vastupidav liik, talub toiduvähesust, ajutist veekogu kuivamist, temperatuurikõikumisi (Meier-Brook 1975) ja madalat kaltsiumisisaldust vees (Mackie, Flippance 1983). Pole väga tundlik reostuse suhtes, sest teda esineb Reini ja Trenti jõe reostunud osades (Kuiper, Wolf 1970; Bishop, Hewitt 1976). See on herneskarpidest vastupidavaim liik veekogu hapestumisele (Økland, Kuiper 1982). Teda on leitud veest pH tasemega 4,4 (Mackie, Flippance 1983). Samuti on see liik vastupidav toksiliste metallide sisaldusele vees (Mackie 1989).

Liigi *P. casertanum* morfoloogiline varieeruvus on herneskarpidede seas suurim (Holopainen,

Hanski 1979). Erinevates veekogudes esineb erineva koja kuju, kumeruse ja kupu paigutusega vorme (Dyduch-Falniowska 1983). Levinuimad vormid on paksu ja kolmnurkse kojaga *ponderosa* Stelfox, 1918, trapetsikujulise kojaga *humeriformis* Stelfox, 1918, ümara väliskujuga *globulare* Clessin, 1873 ja väikeste mõõtmete ning õhukese kojaga *roseum* Scholtz, 1843 (Piechocki 1989). Venemaal tunnustatud süsteemis käsitletakse neid vorme iseseisvate liikidena (Корнюшин 1996). A. Piechocki (1989) arvates võivad liigi *P. casertanum* erinevad vormid olla mõjutatud keskkonnatingimustest. Kuid vormi *globulare* ja tüüpilise vormi vahel on leitud anatoomilisi erinevusi (Корнюшин 1990; Корнюшин 1996; Korniuschin, Glaubrecht 2002) ja ka geneetilisi erinevusi (Schultheiß et al. 2008; Clewing et al. 2013). Samas märgib A. Dyduch-Falniowska (1983), et vormi *globulare* ja tüüpilise vormi vahel esineb üleminekuid.

Molekulaargeneetilised analüüsid on näidanud, et *P. casertanum* ei ole monofüleetiline takson ning Euroopa ja Põhja-Ameerika populatsioonid on geneetiliselt erinevad (Lee, Ó Foighil 2003). Balkani poolsaarel asuvatest järvedest Ohrid ja Prespa on leitud liigile *P. casertanum* morfoloogiliselt sarnaseid, kuid geneetiliselt erinevaid isendeid, mis võib tähendada, et nominaalne liik *P. casertanum* sisaldab tegelikult mitut liiki (Schultheiß et al. 2008).

Venemaal tunnustatud süsteemis on *P. casertanum* s.l. jagatud umbes 30 liigiks, mis kuuluvad perekonna *Euglesa* Leach in Jenyns, 1832 alam perekonda *Casertiana* Fagot, 1892 (Стадниченко 1984; Старобогатов и др. 2004). Neist liikidest on Eestist varem leitud *E. acuminata* (Clessin in Westerlund, 1873), *E. rivularis* (Clessin, 1879), *E. fossarina* (Clessin in Westerlund, 1873), *E. globularis* (Clessin in Westerlund, 1873) (Timm 1975, 1976) ja *E. jaudoiniana* Cassies, 1855 (Корнюшин 1996). Lääne-Euroopas ja Põhja-Ameerikas tunnustatud süsteemis asetseb *P. casertanum* perekonna *Pisidium* alam perekonnas *Cyclocalyx* (Lee, Ó Foighil 2003; Schultheiß et al. 2008; Clewing et al. 2013).

1.3. *Pisidium casertanum* f. *ponderosa* Stelfox, 1918

Liigi *P. casertanum* varieteeti *ponderosa* kirjeldas esmakordselt Arthur Wilson Stelfox (1918) Inglismaal asuvast Grand Junction kanalist. Võrreldes tüüpilise vormiga on vormi *ponderosa* koda kolmnurksem ja paksem, pealtvaates laiem, lukuplaat rohkem kaardus, lukuside lühem (Stelfox 1918) ning kupp paikneb rohkem tagapool (Dyduch-Falniowska 1983). Sarnaselt tüüpilise vormiga on vormi *ponderosa* koda kaetud tihedate ja peenikeste triipudega (Stelfox 1918) (joonis 2). Koja pikkus on kuni 4,3 mm, kõrgus 3,9 mm ja laius 3,1 mm (Glöer, Meier-Brook 2003).



Joonis 2. Liigi *Pisidium casertanum* vormi *ponderosa* koda külgvaates. Püütud Võrtsjärvest. Mõõteskaala – 1 mm

Vorm *ponderosa* on levinud Euroopas ja Lääne-Siberis (Стадниченко 1984). Ta esineb tüüpiliselt järvede litoraalis (Meier-Brook 1975), kuid ka jõgedes (Zhadin 1933; Dyduch-Falniowska 1983). Eelistab madalaid hästi soojenevaid veekogusid (Александров 1965). Peamiselt leidub teda liikuva veega ja liivase põhjaga kohtades (Zettler, Glöer 2008). Eestist on teda varem leitud peamiselt järvedest, vähem jõgedest ja ühest allikast (Тимм

1984). Peipsis esineb mudasel, muda-liivasel ja liivasel substraadil, harvem kruusasel ja savisel põhjal (Timm 1976). Vormi *ponderosa* leidumist Peipsi järves märgib ka U. Bößneck (2010). Peipsis esineb võrdselt nii litoraalis kui profundaalis (Timm 1976), Võrtsjärves peamiselt profundaalis (Timm 1975). Onega järves on leitud kuni 15 m sügavuselt (Александров 1965). M. L. Zettler ja P. Glöer (2008) leidsid Saksamaa siseveekogudest vormi *ponderosa* sagedamini suurte jõgede ja järvede litoraalist, vähem kanalitest, ojadest ja kraavidest (Zettler, Glöer 2008).

Vormi *ponderosa* on korduvalt peetud iseseisvaks liigiks (Odhner 1940; van Benthem Jutting 1947; Zhadin 1952; Boettger 1961; Timm 1975; Старобогатов 1977; Dyduch-Falniowska 1983; Glöer, Zettler 2005; Šivickis 1960), liigi *P. casertanum* alamliigiks (Glöer, Meier-Brook 2003; Zettler, Glöer 2008; Bössneck, 2010) või ökoloogiliseks vormiks (Ellis 1940; Kuiper 1986; Piechocki 1989; Killeen et al. 2004).

Poolas Gardno järves esineb liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi ja vormi *humeriformis* vahel koja kujus sujuv üleminek, kuid üleminek puudub vormide *humeriformis* ja *ponderosa* vahel (Dyduch-Falniowska 1983). Prądnik'i jões esinevad ka tüüpilise vormi ja vormi *ponderosa* vahel üleminekuvormid (Dyduch-Falniowska 1983). A. Piechocki (1972) märgib, et Poolas Pasłęka jões esinevad vormi *ponderosa* ja tüüpilise vormi vahel üleminekuvormid ning seetõttu tuleb vormi *ponderosa* pidada liigi *P. casertanum* ökoloogiliseks vormiks. Saksamaal Stechlinsee järves esinevad kalda lähedal paksukojalised vormid *ponderosa* ja *humeriformis* koos nendevaheliste üleminekuvormidega, 10–20 m sügavusel profundaalis aga õhukese ja ümara kojaga vorm (Meier-Brook, Mothes 1966). Vormide *ponderosa* ja *humeriformis* vahelist selge erinevuse puudumist märgivad ka Gittenberger et al. (2004).

Liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi ja vormi *ponderosa* erinevusi koja pinna mikroskulptuuris on uurinud A. Dyduch-Falniowska (1983), kes leidis, et Poolas Gardno järves on tüüpilise vormi ja vormi *ponderosa* vahel mikroskulptuuris suur erinevus ning peab seetõttu vormi *ponderosa* iseseisvaks liigiks. Samas puudusid erinevused koja mikroskulptuuris nende vormide vahel Prądnik'i jões elavatel isenditel ning seetõttu esineb tema arvates liigi *P. casertanum* ökoloogilisi vorme, kes on morfoloogiliselt sarnased

liigile *P. ponderosum* (Dyduch-Falniowska 1983).

A. V. Kornjušin on leidnud vormi *ponderosa* ja tüüpilise vormi vahel anotoomilisi erinevusi (Корнюшин 1996). Vormil *ponderosa* on tugevamad välimised radiaalsed mantlilihased kui tüüpilisel vormil, kuid need võivad tema arvates olla põhjustatud ka keskkonnatingimustest, kuna sarnased tunnused esinevad ka samuti järvelisel liigil *P. supinum* Schmidt, 1850 ning liigi *P. nitidum* Jenyns, 1832 järvelisel vormil *crassa* Stelfox, 1918 (Корнюшин 1996).

J. G. J. Kuiperi (1963) ei arvates ei saa vormi *ponderosa* pidada iseseisvaks liigiks, kuna selle ja tüüpilise vormi noored isendid on eristamatud. A. Piechocki (1989) pidas vormi *ponderosa* liigi *P. casertanum* ökoloogiliseks vormiks, mis saavutab sellise kuju kaltsiumi- või toitaineterikastes veekogudes. Kõrget kaltsiumisisaldust vees peab karpide koja muutuse põhjuseks ka A. W. Stelfox (1918). J. Favre (1940) arvates on liikide *P. casertanum* ja *P. nitidum* paksukojaliste vormide tekke põhjus vee suur lubjasisaldus ja kõrge temperatuur.

Venemaal tunnustatud süsteemis käsitletakse vormi *ponderosa* iseseisva liigina *E. ponderosa*, mis kuulub perekonna *Euglesa* alam perekonda *Cymatocyclas* Dall, 1903 (Старобогатов и др. 2004). Selles süsteemis eristatakse veel mitu sellele liigile morfoloogiliselt sarnast järvelist liiki nagu *E. platyponderosa* Starobogatov et Korniuschin, 1991, *E. subponderosa* Krivosheina, 1976 ja *E. jaudoiniana* Cassies, 1855 (Корнюшин 1996). Lääne-Euroopas ja Põhja-Ameerikas tunnustatud süsteemis asetseb *P. casertanum* f. *ponderosa* perekonna *Pisidium* alam perekonnas *Cyclocalyx* (Lee, Ó Foighil 2003; Schultheiß et al. 2008; Clewing et al. 2013).

1.4. *Pisidium nitidum* Jenyns, 1832

Liigi *P. nitidum* koda on kuni 4,3 mm pikk, 3,5 mm kõrge ja 2,7 mm lai (Piechocki 1989). Koda on helekollase värvusega (Стадниченко 1984) ning väga läikiv (Killeen et al. 2004) (joonis 3). Kupu ümber on 3–5 süvendit (Glöer, Meier-Brook 2003). *Pisidium nitidum* on

Holarktilise levikuga, teda on leitud ka polaarjoneest põhja pool (Kuiper, Wolf 1970). See on kõige levinum herneskarpp Eestis, teda on leitud järvedest, jõgedest ja mõnest allikast, tihti on ta arvukas (Тимм 1984). Esineb ka ojades, tiikides ja kraavides (Ellis 1940). Elupaigana eelistab vooluveekogusid (Kasprzak 1975). Pole eriti tundlik reostuse suhtes, sest teda esineb Reini jõe reostunud osades (Kuiper, Wolf 1970). Teda on leitud 25 m sügavuselt Genfi järve profundaalist Šveitsis (Germain 1930) ja kuni 2500 m kõrguselt Alpides (Kuiper et al. 1989). Peipsis on ta arvukam litoraalis kuni 1 m sügavusel, kuid leidub ka üle 11 m sügavusel profundaalis (Timm 1976). Eelistab muda-liivast ja mudast põhjasubstraati, kuid esineb ka liivasel põhjal; kivisel, kruusasel ja turbasel põhjal esineb harva (Timm 1976).



Joonis 3. Liigi *Pisidium nitidum* koda külgsuunas. Püütud Amme jõest. Mõõteskaala – 1 mm

Pisidium nitidum on üks kõige varieeruvama koja morfoloogiaga liik herneskarpide seas (Ellis 1940; Piechocki 1989). Varieeruda võivad koja kuju, paksus, lukuplaadi laius ja kumerus (Ellis 1940). Seetõttu on kirjeldatud mitmeid varieteete, näiteks *P. nitidum* var. *fedderseni* Westerlund, 1890, *P. nitidum* var. *bohemica* Westerlund, 1890 ja *P. nitidum* var. *crassa* Stelfox 1918 (Westerlund 1890; Stelfox 1918). Venemaal tunnustatud süsteemis on

liik *P. nitidum* jagatud 13 iseseisvaks liigiks, mis kuuluvad perekonda *Cingulipisidium* Pirogov et Starobogatov, 1974, nendest Euroopas leidub 9 liiki (Пирогов, Старобогатов 1974; Старобогатов и др. 2004). Eestist on neist leitud neli liiki: *Euglesa nitida* (ka nime all *E. splendens* (Baudon, 1857)), *E. fedderseni* Westerlund, 1890, *E. tanuga* Timm, 1975 ja *E. crassa* (Stelfox, 1918) (Timm 1975, 1976). Lääne-Euroopas ja Põhja-Ameerikas tunnustatud süsteemis kuulub *P. nitidum* perekonna *Pisidium* alam perekonda *Cyclocalyx* (Lee, Ó Foighil 2003; Schultheiß et al. 2008; Clewing et al. 2013).

Schultheiß et al. (2008) näitasid, et vormile *crassa* morfoloogiliselt sarnased Balkani poolsaare järvede Ohrid ja Prespa endeemsed liigid *P. edlaueri* Kuiper, 1960 ja *P. maasseni* Kuiper, 1987 ei erine geneetiliselt liigist *P. nitidum*.

1.5. *Pisidium nitidum* f. *crassa* Stelfox, 1918

Liigi *P. nitidum* varieteeti *crassa* kirjeldas esmakordselt Arthur Wilson Stelfox (1918) Inglismaal asuvast Grand Junction kanalist. Vorm *crassa* on väiksem ja kerajam kui tüüpiline vorm, lukuplaat on rohkem kaardus, lateraalsed lukuhambad lühemad ja jämedamad, koda on paksem ning kaetud paksemate triipudega, kupp väiksem ja väljapaistvam, süvendid kupu ümber ei ole selgelt eristatavad (Stelfox 1918) (joonis 4). Koda on värvuselt kollakas-hall (Стадниченко 1984). Koja pikkus on kuni 3,6 mm, kõrgus 3 mm ja laius 2,4 mm (Piechocki 1989).



Joonis 4. Liigi *Pisidium nitidum* vormi *crassa* koda külgvaates. Püütud Võrtsjärvest. Mõõteskaala – 1 mm

Vorm *crassa* esineb Euroopas (Стадниченко 1984) ning Ida- ja Lääne-Siberis (Старобогатов 1977). Teda leidub peamiselt järvedes, kuid ka jõgedes (Piechocki 1989). Eelistab liikuva veega ja liivase põhjaga kohti (Meier-Brook 1975). M. L. Zettler ja P. Glöer (2008) leidsid Saksamaa siseveekogudes vormi *crassa* sagedamini suurte järvede ja jõgede liikuva veega kohtadest liivaselt ja kruusaselt põhjalt.

Eestis on teda varem leitud Võrtsjärvest, Peipsist, mõnedest väiksematest järvedest ja jõgedest (Тимм 1984). Peipsis esineb nii litoraalis kui profundaalis, eelistab muda-liivast ja mudast põhjasubstraati, kivisel ja turbasel põhjal esineb harva (Тимм 1976). Peipsist on teda leitud ka üle 10 m sügavuselt profundaalist (Тимм 1976). Võrtsjärves esineb samuti peamiselt profundaalis (Тимм 1975). Liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi ja vormi *crassa* koosinemist on täheldatud Võrtsjärve litoraalis (Тимм 1975; Корнюшин 1996) ja Grady järves Poolas (Piechocki 1989). Võrtsjärves ei esine A. V. Kornjušin'i andmetel nende vormide vahelisi üleminekuvorme (Корнюшин 1996). Üleminekuvormide puudumist märgivad ka Ja. I. Starobogatov ja È. A. Strelečkaja (Старобогатов, Стрелецкая 1967). Siiski esineb Inglismaal asuvas Grand Junction kanalis vormi *crassa* ja tüüpilise vormi vahel ka üleminekuvorme (Stelfox 1918).

Liigi *P. nitidum* vormi *crassa* on mitmed autorid pidanud iseseisvaks liigiks (Zhadin 1952; Kasprzak 1975; Timm 1975; Старобогатов 1977; Piechocki 1989; Glöer, Zettler 2005).

Mõned uurijad on pidanud teda aga liigi *P. nitidum* ökoloogiliseks vormiks (Ellis 1940; Favre 1940; Dyduch-Falniowska 1983; Kuiper 1986; Glöer, Meier-Brook 2003; Killeen et al. 2004).

Mõlema vormi koja pinna mikroskulptuuri on elektronmikroskoobi abil uurinud A. Dyduch-Falniowska (1983), kes leidis kahe vormi vahel väikeseid erinevusi. A. V. Kornjušin märgib vormi *crassa* ja tüüpilise vormi vahelisi erinevusi anatoomilistes tunnustes (Корнюшин 1996). Vormil *crassa* ei moodusta presifonaalse mantliõmbluse pikkus jala-ava pikkusest rohkem kui 1/5, tüüpilisel vormil on see vähemalt 1/4 (Корнюшин 1996). Välimised radiaalsed mantli lihaskiud on vormil *crassa* tugevamad kui tüüpilisel vormil, need on sarnased liigi *P. casertanum* järvelisel vormil *ponderosa* ja järvelisel liigil *P. supinum* ning võivad seetõttu olla põhjustatud keskkonnatingimustest (Корнюшин 1996).

Venemaal tunnustatud süsteemis on vorm *crassa* jagatud neljaks liigiks, mis kuuluvad perekonna *Cingulipisidium* alam perekonda *Costopisidium* Pirogov et Starobogatov, 1974 (Старобогатов и др. 2004). Nendest liikidest on Eestist leitud *E. crassa* (Stelfox, 1918) ja *E. tanuga* Timm, 1975; viimasel on liigitunnuseks kupu ümber asuv volt (Timm 1975).

Lääne-Euroopas ja Põhja-Ameerikas tunnustatud süsteemis kuulub *Pisidium nitidum* f. *crassa* perekonna *Pisidium* alam perekonda *Cyclocalyx* (Lee, Ó Foighil 2003; Schultheiß et al. 2008; Clewing et al. 2013).

2. MATERJAL JA MEETODID

2.1. Proovide kogumise aeg ja koht

Proovid koguti 2014 a. juulist kuni 2016 a. augustini. Liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi isendid koguti Saadjärvest Saadjärve küla kohalt (koordinaadid: 58°31'49"N, 26°41'47"E). Liigi *P. casertanum* vormi *ponderosa* ja liigi *P. nitidum* vormi *crassa* isendid koguti Võrtsjärvest Kaarlijärve küla kohalt (koordinaadid: 58°17'19"N, 26°8'27"E). Liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi isendid koguti Amme jõest Aovere küla ligidalt (koordinaadid: 58°27'23.70"N, 26°49'8.1"E). Võrtsjärve proovipunktis oli põhjasubstraadiks muda, Saadjärves mudaga kaetud liiv ja Amme jões muda. Proovid võeti 1 mm silmaläbimõõduga kahvaga kuni 1 m sügavusest veest. Isendid sorteeriti proovidest laboris ning fikseeriti 96% etanooli lahuses. Isendite määramiseks kasutati mikroskoopi Nikon SMZ 745T. Töös uuriti Eestist leitud vormidest ainult nelja, kuna ülejäänuid ei õnnestunud tabada analüüsiks vajalikul hulgal.

2.2. Morfoloogilised analüüsid

2.2.1 Koja mõõtmed ja frontaallõike (otsavaate) väliskontuur

Morfomeetriliseks analüüsiks kasutati 14 liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi isendit, 29 vormi *ponderosa* isendit, 57 liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi isendit ja 33 vormi *crassa* isendit. Karpide kodadel mõõdeti üheksa tunnust: pikkus (P), kõrgus (K), laius (L), komissuraalne (kahe poolme kokkupuutepinna) kõrgus (KMK), kupu keskkoha kaugus koja tagumisest servast (KK), luku pikkus (vasaku kojapoolme lateraalsete lukuhammaste tippude vaheline kaugus) (LP), lukuplaadi laius kupu kohal (LL), lukusideme pikkus (LSP) ja lukusideme laius (LSL).

Mõõdetud tunnuste põhjal arvutati kaheksa indeksit: kõrguse ja pikkuse suhe (K/P); laiuse ja pikkuse suhe (L/P); laiuse ja kõrguse suhe (L/K); komissuraalse kõrguse ja koja kõrguse suhe (KMK/K); kupu kauguse ja koja pikkuse suhe (KK/P); luku pikkuse ja koja pikkuse suhe (LP/P); lukuplaadi laiuse ja koja kõrguse suhe (LL/K); lukusideme laiuse ja lukusideme pikkuse suhe (LSL/LSP).

Igast vormist 10 isendit pildistati frontaallõikes ning joonistati nende omavaheliseks võrdlemiseks frontaallõike väliskontuur. Kodade mõõtmiseks ja pildistamiseks kasutati mikroskoopi Nikon SMZ 745T ja mikroskoobikaamerat Nikon Digital Sight DS-Fi ning programmi NIS-Elements Documentation 3.1 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

2.2.2 Statistilised analüüsid

Kodade morfomeetriliste tunnuste vormidevahelise erinevuse testimiseks kasutati Studenti t-testi. Normaalkaotuse olemasolu kontrolliti Shapiro-Wilk testiga (Shapiro, Wilk 1965). Selleks, et leida tunnused, mis eristavad uuritavaid rühmi kõige paremini, viidi läbi kanooniline diskriminantanalüüs. Diskriminantanalüüsis kasutati tunnuste väärtuste ühtlustamiseks logaritmitud andmeid. T-test ja diskriminantanalüüs teostati programmiga MYSTAT 12 (SystatSoftware Inc., San Jose, USA), Shapiro-Wilk test statistikapaketiga R (R Core Team 2014). Tulemused loeti statistiliselt oluliseks p-väärtusega $<0,05$.

2.3. DNA analüüsid

DNA analüüsis kasutati mitokondriaalse geeni tsütokroom c oksüdaas subühik I (COI) järjestust. Analüüsiti igast vormist 3 isendit. DNA eraldamine ja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) viidi läbi Eesti Maaülikooli looduskaitsegeneetika laboris. Analüüsis kasutati isendite kogu pehmet keha. DNA eraldamiseks kasutati kitti DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) ja see toimus vastavalt tootja poolt antud protokollile. Polümeraasi ahelreaktsiooniks kasutati standardseid COI praimereid – LCO1490: 5'-

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' ja HC02198: 5' TAAACTTCAGGGTGA-CCAAAAAATCA- 3' (Folmer et al. 1994). PCR segu valmistamiseks lõppmahus 10 µl võeti 2 µl 5x HOT FIREPolR Blend Master Mix 10 mM MgCl₂ segu (Solis BioDyne, Tartu, Eesti); 0,5 µl *forward* ja *reverse* praimereid; DNA-d võeti vastavelt selle kontsentratsioonile 1–3 µl ja lisati vastav kogus vett. Polümeraasi ahelreaktsiooniks kasutati masinat TProfessional Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Saksamaa). Reaktsiooni algul inkubeeriti segu 15 minutit 95 °C juures, sellele järgnes 34 ahelreaktsiooni tsüklit, mis koosnes kolmest etapist: denaturatsioon temperatuuril 95 °C – 30 sekundit, praimerite seondumine temperatuuril 52 °C – 30 sekundit ning DNA ahela süntees temperatuuril 72 °C – 30 sekundit. Lisasüntees üksikahelate lõpuni sünteesimiseks toimus temperatuuril 72 °C – 3 minutit. PCR-i tulemusi hinnati geelelektrofooresiga 1% agarosgeelil. Mõnede proovide puhul, kus DNA kogus jäi soovitud väiksemaks, tehti lisaks teine polümeraasi ahelreaktsiooniprotsess tsüklite arvuga 20 ning praimerite seondumistemperatuuriga 48 °C. Nukleotiidide puhastamiseks võeti 1 µl FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase 1 U/µl ensüümi (Thermo Scientific, Waltham, USA) ja praimerite eemaldamiseks 1 µl Exonuclease I 20 U/µl eksonukleaasi (Thermo Scientific, Waltham, USA). Reaktsiooni tsüklil koosnes järgmistest osadest: 37 °C – 30 minutit ja 80 °C – 15 minutit. DNA sekveneerimine toimus Eesti Biokeskuse tuumiklaboris (Tartu, Eesti).

COI geeni *forward* ja *reverse* ahela konsensus moodustati programmiga BioEdit 7.2.5. (Hall 1999), kus lõigati välja praimerite seondumissaitide lähedal olevad ebaselged piirkonnad. Erinevate isendite geenijärjestused joondati programmiga Mega 7.0 (Kumar et al. 2016) Clustal W meetodil. Analüüsimiseks kasutati 608 aluspaari pikkust fragmenti.

Fülogeneetiliste suhete uurimiseks kasutati peamiselt GenBank'is olevaid sugukonna *Sphaeriidae* geenijärjestusi. GenBank'ist saadud järjestuste registreerimisnumbrid on näidatud tabelis 1. Välisrühmaks valiti liik *Eupera ferruginea* (Krauss, 1848). Heuristiline otsing viidi läbi 100 juhusliku sekvensi korduse astmelise lisamisega kasutades puu kaheks jagamise ja taasühendamise (TBR) algoritmi. Analüüsis kasutati koodonite I, II ja III positsioone ja mittekodeerivaid saite. Puuduvate nukleotiididega saidid jäeti analüüsist välja. *Bootstrap*'i väärtuste saamiseks viidi läbi 100 kordust. Fülogeneesipuu harud

bootstrap'i väärtusega alla 50% koondati. Fülogeneetilisi suhteid uuriti maksimaalse parsimoonia meetodil kasutades programmi Mega 7.0 (Kumar et al. 2016).

Tabel 1. Fülogeneetilises analüüsis kasutatud GenBank'is olevad COI geeni järjestuste registreerimisnumbrid, kogumiskohad ja kirjanduse viited

Liik	Registreerimisnumber GenBank'is	Kogumiskoht	Viited
<i>Eupera ferruginea</i> (Krauss, 1848)	KF483420	Uganda	Clewing et al. 2013
<i>E. ferruginea</i>	KF483421	Uganda	Clewing et al. 2013
<i>Musculium indicum</i> Deshayes, 1854	KF483411	Nepal	Clewing et al. 2013
<i>M. kashmirensis</i> Prashad, 1937	KF483359	Hiina	Clewing et al. 2013
<i>M. lacustre</i> (Müller, 1774)	KF483391	Gruusia	Clewing et al. 2013
<i>Pisidium (Cyclocalyx) atkinsonianum</i> Theobald, 1876	KF483408	Nepal	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) casertanum</i> (Poli, 1791)	KF483356	Albaania	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) casertanum</i>	KF483386	Saksamaa	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) casertanum</i>	KF483392	Kreeka	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) casertanum</i>	KF483394	Iraan	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) casertanum</i>	KF483400	Makedoonia	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) casertanum</i>	KF483418	Türgi	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) costulosum</i> Connolly, 1931	KF483422	Lõuna-Aafrika	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) edlaueri</i> Kuiper, 1960	KF483403	Makedoonia	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) edlaueri</i>	KF483404	Makedoonia	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) globulare</i> Westerlund, 1874	KF483423	Saksamaa	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) henslowanum</i> (Sheppard, 1825)	KF483398	Makedoonia	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) lilljeborgii</i> Esmark & Hoyer, 1886	KF483406	Norra	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) nitidum</i> Jenyns, 1832	KF483364	Hiina	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) nitidum</i>	KF483384	Hiina	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) nitidum</i>	KF483385	Saksamaa	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) obtusale</i> (Lamarck, 1818)	KF483387	Saksamaa	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) personatum</i> Malm, 1855	KF483389	Gruusia	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) personatum</i>	KF483401	Makedoonia	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) personatum</i>	KF483417	Türgi	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) subtruncatum</i> Malm, 1855	KF483372	Hiina	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) subtruncatum</i>	KF483390	Gruusia	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) subtruncatum</i>	KF483395	Itaalia	Clewing et al. 2013

<i>P. (C.) subtruncatum</i>	KF483402	Makedoonia	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) supinum</i> Schmidt, 1850	KF483388	Saksamaa	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) zugmayeri</i> Weber, 1910	KF483377	Hiina	Clewing et al. 2013
<i>P. (C.) viridarium</i> Kuiper, 1956	KF483397	Lesotho	Clewing et al. 2013
<i>P. (Pisidium) amnicum</i> (Müller, 1774)	KX351303	Eesti	Voode 2017
<i>P. (P.) amnicum</i>	KX351310	Eesti	Voode 2017
<i>P. (P.) amnicum</i>	KX351312	Eesti	Voode 2017
<i>P. (Odhneripisidium) annandalei</i> Prashad, 1925	KF483409	Nepal	Clewing et al. 2013
<i>P. (O.) kuiperi</i> Dance, 1967	KF483407	Nepal	Clewing et al. 2013
<i>P. (O.) stewarti</i> Preston, 1909	KF483357	Hiina	Clewing et al. 2013
<i>Sphaerium striatinum</i> (Lamarck, 1818)	AF120667	andmed puuduvad	Giribet, Wheeler 2002
<i>S. nucleus</i> (Studer, 1820)	KC429133	andmed puuduvad	Sharma et al. 2013

3. TULEMUSED

3.1. Morfoloogilised analüüsid

3.1.1. Koja mõõtmed

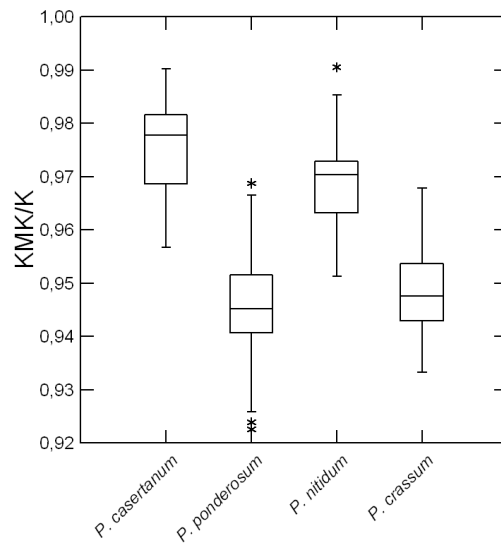
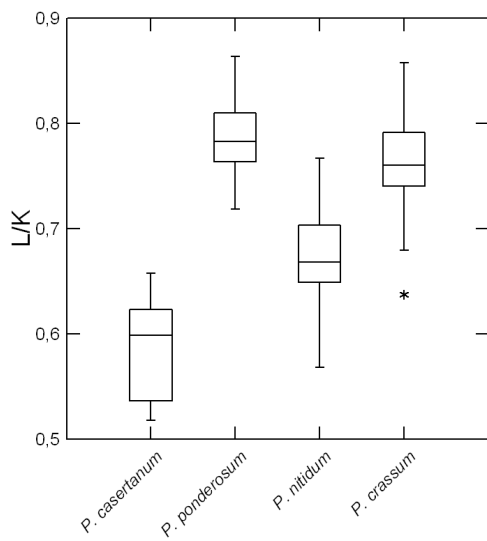
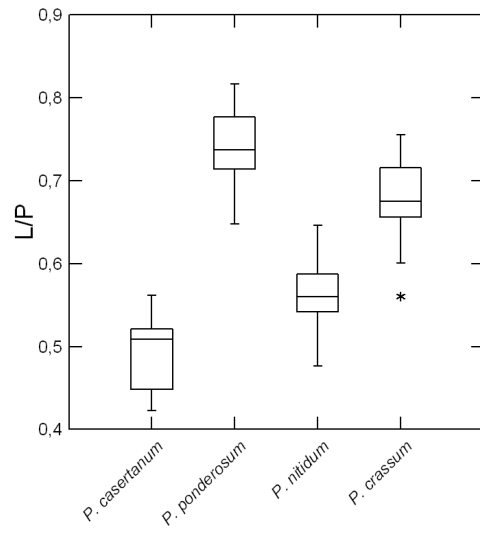
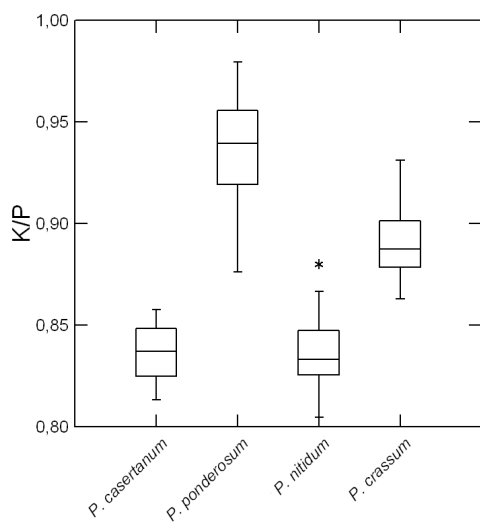
Studenti t-testi järgi erinesid liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi ja vormi *ponderosa* vahel statistiliselt oluliselt järgmised indeksid: kõrguse ja pikkuse suhe (K/P), laiuse ja pikkuse suhe (L/P), laiuse ja kõrguse suhe (L/K), komissuraalse kõrguse ja koja kõrguse suhe (KMK/K), kupu kauguse ja koja pikkuse suhe (KK/P) ning lukuplaadi laiuse ja koja kõrguse suhe (LL/K) (tabel 2, joonis 5). Luku pikkuse ja koja pikkuse suhe (LP/P) ning lukusideme laiuse ja lukusideme pikkuse suhe (LSL/LSP) ei erinenud statistiliselt oluliselt. Liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi ja vormi *crassa* vahel erinesid kõik indeksid statistiliselt oluliselt (tabel 3, joonis 5).

Tabel 2. Liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi ja vormi *ponderosa* morfoomeetriliste andmete alusel arvatud indekse aritmeetilised keskmised, minimaalne ja maksimaalne väärtus ning erinevus kahe vormi vahel Studenti t-testi alusel. Lühendid: K/P – kõrguse ja pikkuse suhe; L/P – laiuse ja pikkuse suhe; L/K – laiuse ja kõrguse suhe; KMK/K – komissuraalse kõrguse ja koja kõrguse suhe; KK/P – kupu kauguse ja koja pikkuse suhe; LP/P – luku pikkuse ja koja pikkuse suhe; LL/K – lukuplaadi laiuse ja koja kõrguse suhe; LSL/LSP – lukusideme laiuse ja lukusideme pikkuse suhe; n – mõõdetud isendite arv; SH – standardhälve; t – t-testi teststatistik; p – olulisustõenäosus

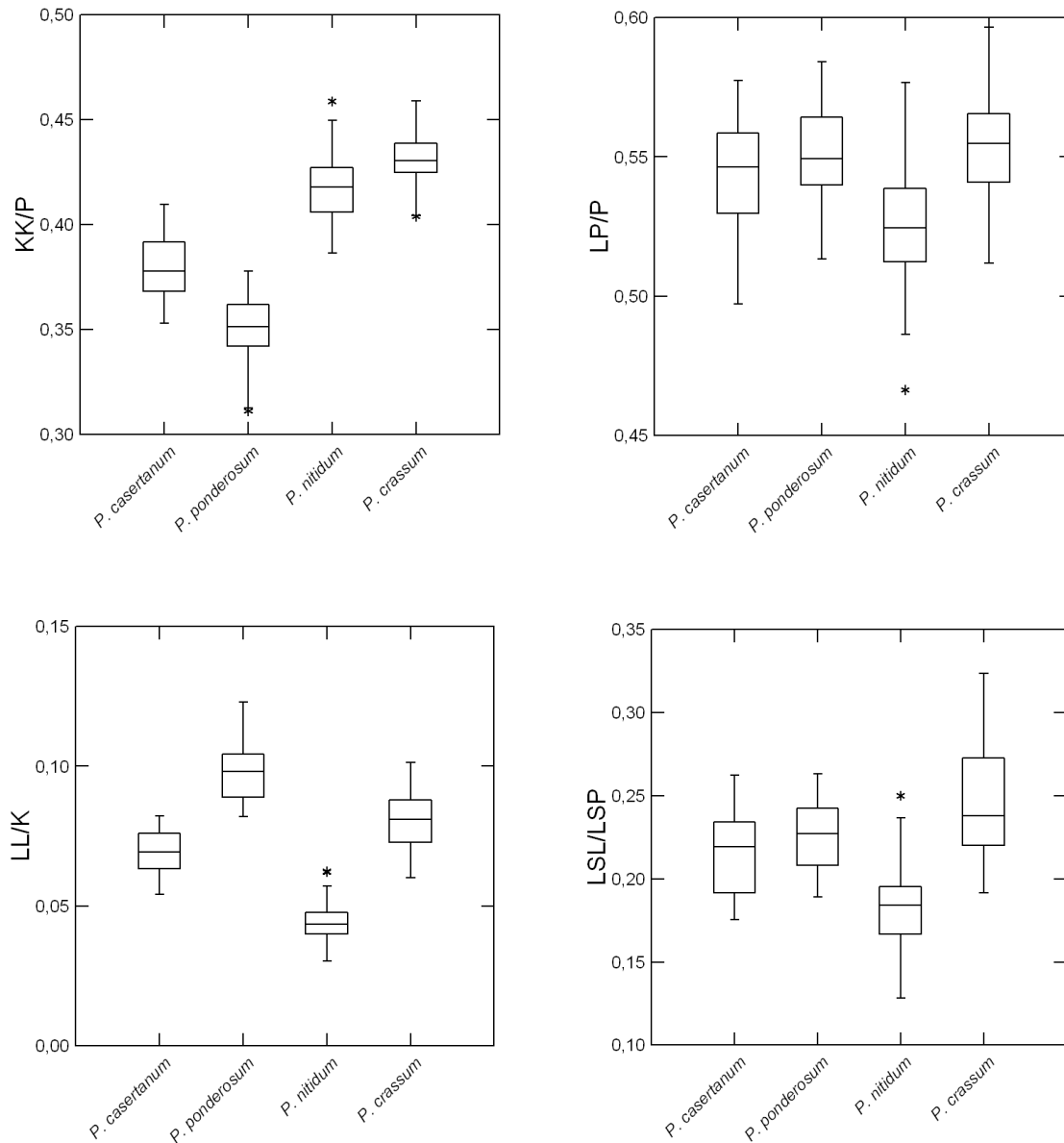
Indeks	<i>P. casertanum</i>		<i>P. casertanum</i> f. <i>ponderosa</i>		t	p-väärtus
	n=14		n=29			
	keskm.± SH	min.–maks.	keskm.± SH	min.–maks.		
K/P	0,84±0,01	0,81–0,86	0,94±0,03	0,88–0,98	-16,563	<0,0001
L/P	0,49±0,04	0,42–0,56	0,74±0,05	0,65–0,82	-16,33	<0,0001
L/K	0,59±0,05	0,52–0,66	0,78±0,04	0,72–0,86	-13,959	<0,0001
KMK/K	0,98±0,01	0,96–0,99	0,95±0,01	0,92–0,97	8,935	<0,0001
KK/P	0,38±0,02	0,35–0,41	0,35±0,02	0,31–0,38	5,852	<0,0001
LP/P	0,55±0,02	0,50–0,58	0,55±0,02	0,51–0,58	-0,568	0,576
LL/K	0,07±0,01	0,05–0,08	0,10±0,01	0,08–0,12	-10,287	<0,0001
LSL/LSP	0,22±0,03	0,18–0,26	0,23±0,02	0,19–0,26	-1,356	0,190

Tabel 3. Liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi ja vormi *crassa* morfomeetriliste andmete alusel arvutatud indekseid aritmeetilised keskmised, minimaalne ja maksimaalne väärtus ning erinevus kahe vormi vahel Studenti t-testi alusel. Lühendid: K/P – kõrguse ja pikkuse suhe; L/P – laiuse ja pikkuse suhe; L/K – laiuse ja kõrguse suhe; KMK/K – komissuraalse kõrguse ja koja kõrguse suhe; KK/P – kupu kauguse ja koja pikkuse suhe; LP/P – luku pikkuse ja koja pikkuse suhe; LL/K – lukuplaadi laiuse ja koja kõrguse suhe; LSL/LSP – lukusideme laiuse ja lukusideme pikkuse suhe; n – mõõdetud isendite arv; SH – standardhälve; t – t-testi teststatistik; p – olulisustõenäosus

Indeks	<i>P. nitidum</i>		<i>P. nitidum</i> f. <i>crassa</i>		t	p-väärtus
	keskm.± SH	min.–maks.	keskm.±SH	min.–maks.		
	n=57		n=33			
K/P	0,84±0,02	0,80–0,88	0,89±0,02	0,86–0,93	15,441	<0,0001
L/P	0,56±0,04	0,48–0,65	0,68±0,05	0,56–0,76	12,707	<0,0001
L/K	0,67±0,04	0,57–0,77	0,76±0,05	0,64–0,86	8,909	<0,0001
KMK/K	0,97±0,01	0,95–0,99	0,95±0,01	0,93–0,97	-10,022	<0,0001
KK/P	0,42±0,02	0,39–0,46	0,43±0,01	0,40–0,46	3,716	0,0004
LP/P	0,52±0,02	0,47–0,58	0,55±0,02	0,51–0,60	6,404	<0,0001
LL/K	0,04±0,01	0,03–0,06	0,08±0,01	0,06–0,10	17,506	<0,0001
LSL/LSP	0,18±0,02	0,13–0,25	0,25±0,03	0,19–0,32	9,5188	<0,0001



Joonis 5. Järgneb järgmisel leheküljel



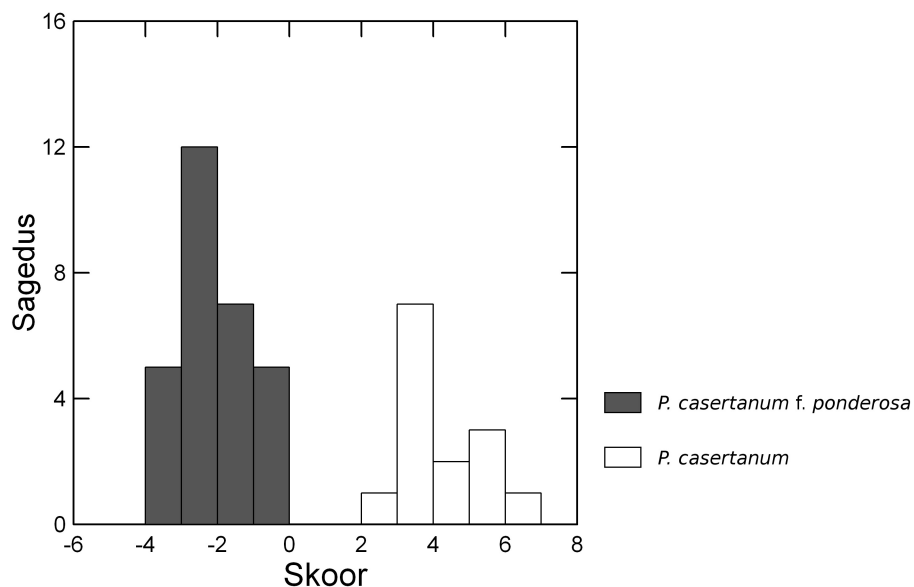
Joonis 5. Indeksite keskmised väärtused uuritud vormidel. Kasti keskmine joon näitab mediaani, kasti piirid näitavad alumist ja ülemist kvartiili, „vuntsid“ näitavad alumist ja ülemist 1,5 kordset kvartiilivahemikku, tärniga on märgitud erindid. Lühendid: K/P – kõrguse ja pikkuse suhe; L/P – laiuse ja pikkuse suhe; L/K – laiuse ja kõrguse suhe; KMK/K – komissuraalse kõrguse ja koja kõrguse suhe; KK/P – kupu kauguse ja koja pikkuse suhe; LP/P – luku pikkuse ja koja pikkuse suhe; LL/K – lukuplaadi laiuse ja koja kõrguse suhe; LSL/LSP – lukusideme laiuse ja lukusideme pikkuse suhe

3.1.2. Diskriminantanalüüs

Kanoonilise diskriminantanalüüsi tulemuste järgi eristusid *P. casertanum* ja *P. casertanum* f. *ponderosa* üksteisest statistiliselt oluliselt (Wilks' lambda: 0,103; approx. F-ratio: 31,950; $P < 0,0001$). Diskriminantfunktsiooni eigenväärtus oli 8,714. Mõlema vormi isendid klassifitseeriti 100% juhtudest õigesti. Diskriminantfunktsioon oli tugevas positiivses korrelatsioonis koja pikkuse (P) ja kõrgusega (K) ning negatiivses korrelatsioonis komissuraalse kõrguse (KMK) ja koja laiusega (L) (tabel 4). Skooride histogrammil on näha, et liigi *P. casertanum* tüüpiline vorm oli seotud kõrgema skooriga ja vorm *ponderosa* madalama skooriga (joonis 6).

Tabel 4. Diskriminantfunktsiooni standardiseeritud koefitsiendid

Tunnus	Koefitsient
Log pikkus (P)	2,333
Log kõrgus (K)	2,263
Log laius (L)	-1,413
Log komissuraalne kõrgus (KMK)	-2,952
Log kupu kaugus (KK)	0,222
Log luku pikkus (LP)	-0,459
Log luku laius (LL)	-0,513
Log lukusideme pikkus (LSP)	-0,178
Log lukusideme laius (LSL)	-0,144

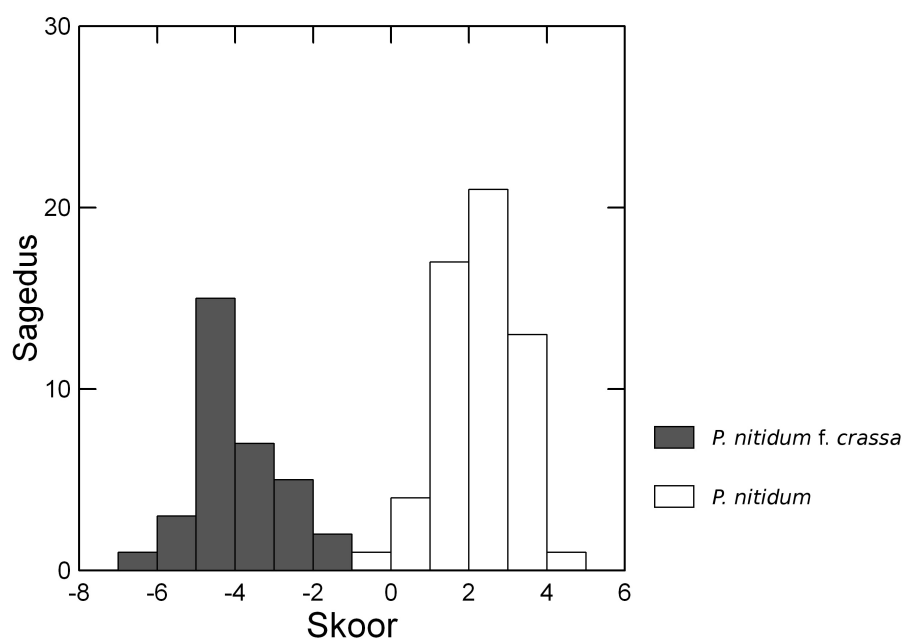


Joonis 6. Liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi ja vormi *ponderosa* diskriminantanalüüsi skooride histogramm

Liigi *Pisidium nitidum* tüüpiline vorm ja vorm *crassa* eristusid üksteisest statistiliselt oluliselt (Wilks' lambda: 0,097; approx. F-ratio: 82,994; $P < 0,0001$). Diskriminantfunktsiooni eigenväärtus oli 9,337. Mõlema vormi isendid klassifitseeriti 100% juhtudest õigesti. Diskriminantfunktsioon oli tugevas positiivses korrelatsioonis komissuraalse kõrguse (KMK) ja koja pikkusega (P) ning negatiivses korrelatsioonis koja kõrguse (K), luku laiuse (LL) ja koja laiusega (L) (tabel 5). Liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi isenditel oli kõrgem skoor ja vormi *crassa* isenditel madalam skoor (joonis 7).

Tabel 5. Diskriminantfunktsiooni standardiseeritud koefitsiendid

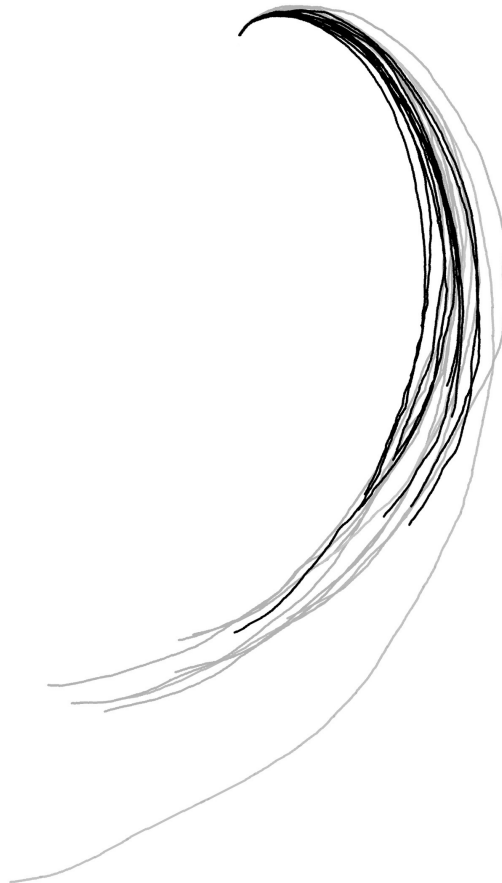
Tunnus	Koefitsient
Log pikkus (P)	2,520
Log kõrgus (K)	-4,600
Log laius (L)	-0,691
Log komissuraalne kõrgus (KMK)	3,033
Log kupu kaugus (KK)	0,099
Log luku pikkus (LP)	0,012
Log luku laius (LL)	-0,720
Log lukusideme pikkus (LSP)	0,288
Log lukusideme laius (LSL)	-0,396



Joonis 7. Liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi ja vormi *crassa* diskriminantanalüüsi skooride histogramm

3.1.3. Koja frontaallõike väliskontuur

Koja frontaallõike väliskontuurid varieerusid tugevasti kõikidel vormidel sama vormi piires. Liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi ja vormi *ponderosa* vahel ei olnud väliskontuuris olulist erinevust (joonis 8). Rohkem eristusid üksteisest liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi ja vormi *crassa* väliskontuurid (joonis 9).



Joonis 8. Liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi (must) ja vormi *ponderosa* (hall) koja frontaallõike väliskontuurid



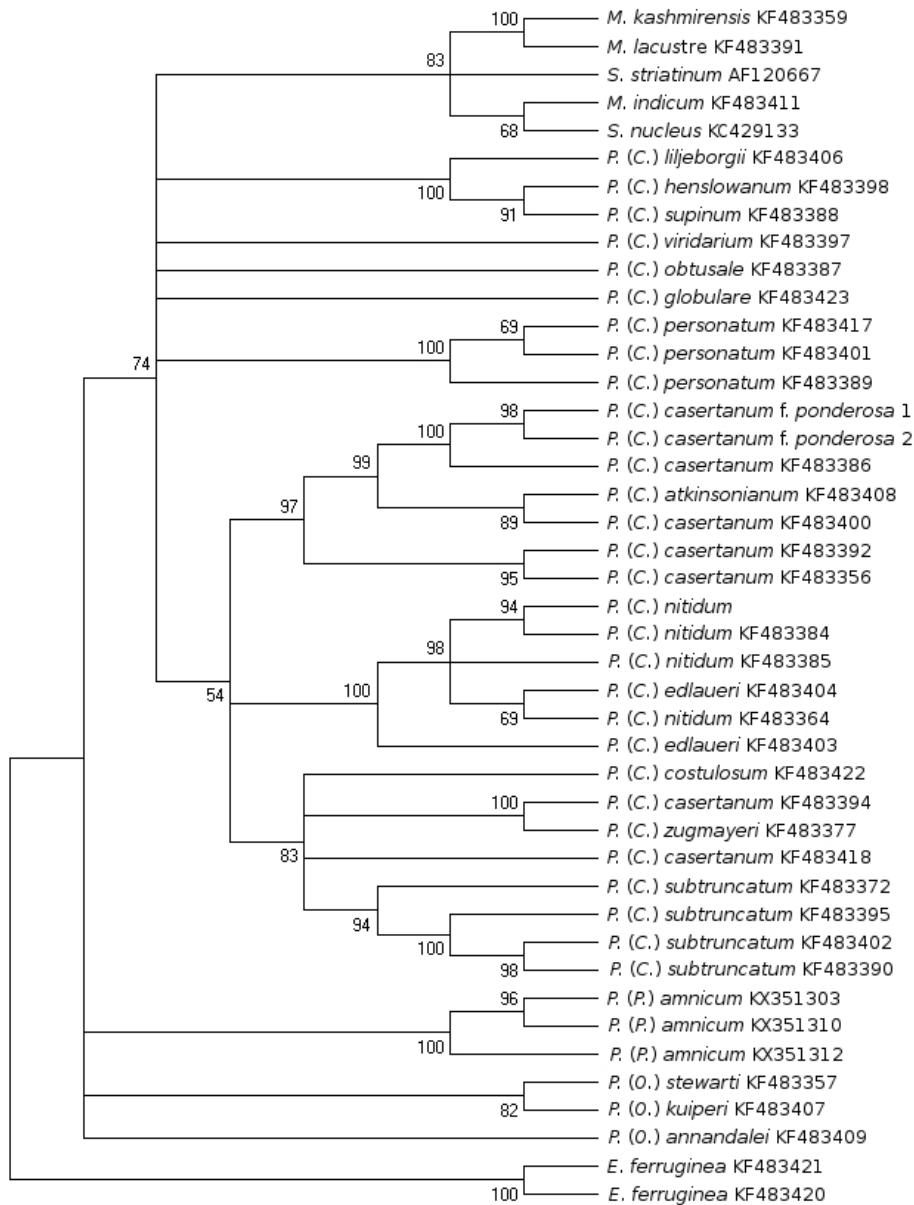
Joonis 9. Liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi (must) ja vormi *crassa* (hall) koja frontaallõike väliskontuurid

3.2. DNA analüüsid

Sekveneerimine õnnestus autori materjalis kahe *P. casertanum* f. *ponderosa* isendi ja ühe *P. nitidum* isendi puhul. Analüüsis kasutati 597 nukleotiidi pikkust fragmenti. Vormi *ponderosa* isendid olid geneetiliselt identsed. Erinevus liigi *P. casertanum* geenipangas olevate isenditega oli 1 (0,2% lahknevus) kuni 65 nukleotiidi (11,1% lahknevus). Kõige väiksem oli erinevus Saksamaa populatsiooni isendiga, kõige rohkem eristusid Iraani ja Türgi populatsiooni isendid.

Fülogeneetilise analüüsi tulemused näitasid peamiselt GenBank'i andmete põhjal, et liik *P. casertanum* ei ole monofüleetiline, kuna Türgi ja Iraani populatsioonide isendid (KF483394 ja KF483418) klasterduvad liikidega *P. subtruncatum* Malm, 1855; *P. zugmayeri* Weber, 1910 ja *P. costulosum* Connolly, 1931 (joonis 10). Ülejäänud liigi *P.*

casertanum isendid klasterduvad liigiga *P. atkinsonianum* Theobald, 1876 ja ka selles töös sekveneeritud liigi *P. casertanum* vormiga *ponderosa*. Alamperekond *Cyclocalyx* moodustab klaadi *Sphaerium/Musculium* rühmaga ning kogu rühm on sõsarrühmaks alamperekondadele *Pisidium* s.s. ja *Odhneripisidium*. *Pisidium nitidum* ja *P. edlaueri* moodustavad tugevalt toetatud klaadi, kuhu kuulub ka selles töös sekveneeritud liigi *P. nitidum* isend.



Joonis 10. Maksimaalse parsimoonia konsensuse fülogeneetiline puu *bootstrap*'i väärtustega. Üks liigi *P. nitidum* ja kaks liigi *P. casertanum* vormi *ponderosa* järjestust on uued

4. ARUTELU

4.1. Koja morfoloogia

Koja morfomeetrisel analüüsil selgus, et liigi *P. casertanum* vorm *ponderosa* eristub tüüpilisest vormist lisaks teistele suhtelistele mõõtmetele ka suhteliselt laiema koja ja rohkem tagapool asetseva kupu poolest, mis ühtib varem kirjanduses märgituga (Stelfox 1918; Dyduch-Falniowska 1983). Diskriminantanalüüsi tulemused näitasid, et *P. casertanum* ja *P. casertanum* f. *ponderosa* on üksteisest morfoloogiliselt selgesti eristatavad ning vormi *ponderosa* eristab tüüpilisest vormist kõige paremini väiksem komissuraalne kõrgus. Koja frontaallõike väliskontuuride võrdlusel selgus, et need kaks vormi ei ole võrdleva meetodi abil selgelt eristatavad, seega ei ole see meetod nende vormide eristamiseks sobiv.

Varem on kirjanduses märgitud, et liigi *P. nitidum* vorm *crassa* erineb tüüpilisest vormist laiema koja poolest (Timm 1975), mis ühtib käesoleva töö tulemustega. Diskriminantanalüüs näitas, et need kaks vormi on üksteisest morfoloogiliselt selgesti eristatavad ning vormi *crassa* eristab kõige paremini tüüpilisest vormist suurem koja kõrgus. Koja frontaallõike väliskontuuride analüüs näitas, et mõlemal vormil on suur vormisisene varieeruvus, kuid väliskontuurid kahe vormi vahel olid siiski erinevad, mistõttu võib frontaallõike väliskontuuri kasutada ühe määramistunnusena nende vormide eristamisel.

Varem on koja väliskontuuri kui määramistunnuse kasutatavust uuritud käesoleva töö autori poolt liikide *P. amnicum* ja *P. inflatum* peal, mille tulemused näitasid, et seda meetodit ei saa nende vormide eristamiseks kasutada, kuna lisaks tüüpilistele vormidele esines ka vahepealseid vorme (Voode 2017). Samuti ei saa seda meetodit kasutada mõnede keraskarpide liikide puhul (Voroshilova 2013).

Herneskarvide koja morfoloogiliste muutuste põhjuseks võivad olla erinevad

keskkonnatingimused (Корнюшин 1996). Funk ja Reckendorfer (2008) näitasid, et liigi *P. subtruncatum* Malm, 1955 isenditel, kes elavad mudases elukohas, on koda madalam kui liivasel põhjal elavatel isenditel. See võib olla põhjustatud sellest, et madalam koda lihtsustab tihedas mudas liikumist, kõrgem ja lühem koda aga lisab jämedamas substraadis stabiilsust (Funk, Reckendorfer 2008). Kuid põhjasubstraat ei saa käesoleva uuringu alusel olla liikide *P. casertanum* ja *P. nitidum* kõrgekojaliste vormide tekke põhjuseks, kuna Võrtsjärve proovikohas oli põhjasubstraadiks muda. A. Piechocki (1989) arvates põhjustavad liigi *P. casertanum* kolmnurkse kojaga vormi *ponderosa* teket vee suur toiteainete ja kaltsiumisisaldus. Liigi *P. casertanum* koja mass suureneb ka aluselise suurenedes (Saunders, Kling 1990). Ebapärlikarpide puhul on näidatud, et kõrgema pH tasemega jõgedes elavatel isenditel on kõrgem koda (Preston et al. 2010). Jõekarplastel suureneb pehme põhjaga ja eutroofsetes tingimustes koja suhteline kõrgus ja koja laius pealtvaates (Eager 1978). Täheldatud on jõekarplaste koja morfoloogia seost vooluveekogu suurusega, väikestes ojades on sama liigi isendid pealtvaates kitsamad ja lapikuma kujuga, suuremates jõgedes aga laiemad (Ortmann 1920). Samuti on jõgede ülemjooksul isendid kitsamad ning alamjooksul laiemad (Ortmann 1920). Hornbach et al. (2010) näitasid oma töös samuti, et võrreldes ülemjooksuga on alamjooksul elavatel jõekarplastel koda suhteliselt laiem ning ka kõrgem, ülemjooksul on koda aga siledama skulptuuriga. Samuti on tigidel aeglasema vooluga alamjooksul koda laiem ja jämedama skulptuuriga kui kiire vooluga ülemjooksul (Minton et al. 2008). R. M. C. Eagar'i (1978) arvates on karpide koja muutuse üheks põhjuseks voolukiirus, sama liigi järvelistel isenditel on koda laiem kui jõelistel isenditel. Lainetusele avatud piirkondades on jõekarplaste koda raskem ning varjatud kohtades kergem, kuna raskem koda on lainetuses stabiilsem (Hinch, Bailey 1988). Ka hernes- ja keraskarpidel on liikuva veega elupaikades koda raskem ning paksem (Bailey et al. 1983). Elupaigast tulenevat koja kuju muutust on autor täheldanud ka liigil *P. amnicum*, mille laiema kojaga vorm *inflatum* esineb liivase põhjaga kohtades (Voode 2017).

4.2 Geneetilised analüüsid

Fülogeneetiline analüüs näitas, et *P. casertanum* ei ole monofüleetiline takson, mis ühtib varem kirjanduses märgituga (Lee, Ó Foighil 2003; Schultheiß et al. 2008; Clewing et al. 2013). See näitab, et nominaalne liik *P. casertanum* võib sisaldada mitut liiki (Schultheiß et al. 2008). *Pisidium casertanum* f. *ponderosa* COI geeni järjestused ei eristu oluliselt geenipangas olevast Saksamaalt püütud liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi järjestusest. Seega ei saa vormi *ponderosa* pidada iseseisvaks liigiks. Amme jõest püütud liigi *P. nitidum* isendi geenijärjestus klasterdub teiste liikide *P. nitidum* ja *P. edlaueri* järjestustega.

Käesoleva töö tulemuste põhjal moodustab alam perekond *Cyclocalyx* klaadi *Sphaerium/Musculium* rühmaga, mis on vastuolus varasemate uuringutega, kus alam perekond *Cyclocalyx* on sõsarrühmaks *Sphaerium/Musculium* rühmale (Lee, Ó Foighil 2003; Schultheiß et al. 2008; Clewing et al. 2013). *Pisidium nitidum* ja *P. edlaueri* moodustasid monofüleetilise rühma, mis ühtib varasemate töödega (Clewing et al. 2013).

Morfoloogiliselt erinevad liigid võivad olla geneetiliselt eristamatud, näiteks Balkani poolsaare järvede Ohrid ja Prespa endeemsed liigid *P. maasseni* ja *P. edlaueri* ei erine vaatamata morfoloogilisele erinevusele geneetiliselt liigist *P. nitidum* (Schultheiß et al. 2008). Liigist *P. amnicum* laiema koja poolest eristuv *P. inflatum* ei erine tüüpilisest liigist geneetiliselt (Voode 2017). Samas võivad morfoloogiliselt raskesti eristatavad liigid olla geneetiliselt erinevad, nagu on näidatud rändkarpide puhul (Beggel et al. 2015).

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli selgitada, kas *P. casertanum* ja *P. casertanum* f. *ponderosa* ning *P. nitidum* ja *P. nitidum* f. *crassa* on erinevad liigid. Selleks võrreldi nende vormide morfomeetrilisi andmeid, koja frontaallõike väliskontuure ja esimese vormide-paari puhul ka COI geeni. Morfomeetrilise analüüsi tulemusel selgus, et liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi ja vormi *ponderosa* vahel erinesid statistiliselt oluliselt mitmed indeksid: kõrguse ja pikkuse suhe (K/P), laiuse ja pikkuse suhe (L/P), laiuse ja kõrguse suhe (L/K), kommissuraalse kõrguse ja koja kõrguse suhe (KMK/K), kupu kauguse ja koja pikkuse suhe (KK/P) ning lukuplaadi laiuse ja koja kõrguse suhe (LL/K). Luku pikkuse ja koja pikkuse suhe (LP/P) ning lukusideme laiuse ja lukusideme pikkuse suhe (LSL/LSP) ei erinenud statistiliselt oluliselt.

Liigi *P. casertanum* tüüpilise vormi ja vormi *ponderosa* frontaallõike väliskontuurid ei erinenud üksteisest märgatavalt ning seega ei saa väliskontuure võrdlevat meetodit kasutada nende vormide eristamiseks. DNA sekveneerimine õnnestus liigi *P. casertanum* vormi *ponderosa* puhul, kuid ei õnnestunud tüüpilise vormi puhul. Võrreldes liigi *P. casertanum* vormi *ponderosa* GenBank'is olevate tüüpilise vormi järjestustega ei ole nende vormide vahel olulisi erinevusi. Seega ei saa vormi *ponderosa* pidada iseseisvaks liigiks.

Liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi ja vormi *crassa* vahel erinesid kõik morfomeetrilised indeksid statistiliselt oluliselt. Samuti erinesid nende vormide frontaallõike väliskontuurid üksteisest, seega on võimalik väliskontuuri kasutada nende vormide eristamiseks ühe määramistunnusena. DNA sekveneerimine õnnestus liigi *P. nitidum* tüüpilise vormi puhul, kuid mitte vormi *crassa* puhul. Seetõttu ei saa vormi *crassa* geneetilist iseseisvust kinnitada.

Käesoleva töö põhjal võib väita, et liigi *P. casertanum* seni uuritud tüüpiliste isendite ja tema vormi *ponderosa* vahel pole geenijärjestuses ega frontaallõike kontuuris olulisi erinevusi. Olulisi erinevusi on koja morfomeetrilistes indeksites, kuid need võivad olla

tingitud erinevast elupaigast. *Pisidium nitidum* ja tema vorm *crassa* erinesid üksteisest oluliselt nii koja morfomeetriliste indeksite kui ka frontaallõike kontuuri poolest. Kahjuks pole seni võimalik määrata nende geneetilist erinevust.

Edaspidistes uuringutes tuleks määrata ka liigi *P. nitidum* eri vormide geenijärjestused, et selgitada nende geneetilist eraldatust. Samuti tuleks laiendada uuringuid, võrreldavaid meetodeid kasutades, Eesti fauna ülejäänud herneskarpidetele. Selleks on aga vaja koguda suuremal hulgal anatoomiliseks ja molekulaarbioloogiliseks tööks sobivat materjali võimalikult paljudest elupaikadest, sealhulgas nii rohkem eri liike kui ka rohkem isendeid igast liigist.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adler, M.** (1994). Zur Systematik der Europäischen Sphaeriiden. – *Corresp.-blad Ned. Malac. Ver.* No. 278, pp. 58–63.
- Bailey, R. C., Anthony, E. H., Mackie, G. L.** (1983). Environmental and taxonomic variation in fingernail clam (*Bivalvia: Pisidiidae*) shell morphology. – *Canadian Journal of Zoology*. Vol. 61, pp. 2781–2788.
- Beggel, S., Cerwenka, A. F., Brandner, J., Geist, J.** (2015). Shell morphological versus genetic identification of quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). – *Aquatic Invasions*. Vol. 10, pp. 93–99.
- Bishop, M. J., Hewitt, S. J.** (1976). Assemblages of *Pisidium* species (*Bivalvia, Sphaeriidae*) from localities in eastern England. – *Freshwater Biology*. Vol. 6, pp. 177–182.
- Boettger, C. R.** (1961). Zur Systematik der in die Gattung *Pisidium* C. Pfeiffer gerechneten Muscheln. – *Archiv für Molluskenkunde*. Vol. 90, No. 4, pp. 227–248.
- Bößneck, U.** (2010). Beitrag zur Süßwassermollusken von Estland und Lettland. – *Mitt. dtsh. malakozool. Ges.* Vol. 83, pp. 25–32.
- Clessin, S.** (1879). Familie der Cycladeen. Nürnberg: Verlag von Bauer & Raspe. 282 S.
- Clewing, C., Bössneck, U., Oheimb, P. V. von, Albrecht, C.** (2013). Molecular phylogeny and biogeography of a high mountain bivalve fauna: the *Sphaeriidae* of the Tibetan Plateau. – *Malacologia*. Vol. 56, No. 1–2, pp. 231–252.
- Dyduch-Falniowska, A.** (1982). Oscillations in density and diversity of *Pisidium* communities in two biotopes in Southern Poland. – *Hydrobiological Bulletin*. Vol. 16, No. 2–3, pp. 123–132.
- Dyduch-Falniowska, A.** (1983). Shell microstructure and systematics of *Sphaeriidae* (*Bivalvia, Eulamellibranchiata*). – *Acta Zoologica Cracoviensia*. Vol. 26, No. 9, pp. 251–296.
- Eagar, M. C.** (1978). Shape and function of the shell: a comparison of some living and fossil bivalve molluscs. – *Biological Reviews*. Vol. 53, pp. 169–210.
- Ellis, A. E.** (1940). The identification of the British species of *Pisidium*. – *Proceedings of the Malacological Society*. Vol. 24, pp. 44–88.
- Favre, J.** (1940). La faune malacologique post-glaciaire et actuelle du lac du Bourget. – *Les Annales de l'École Nationale des Eaux et Forêts et de la Station de Recherches et expériences*. T. 7. Fasc. 2, p. 295–475.
- 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*. Vol. 3, No 5, pp. 294–299.

- Funk, A., Reckendorfer, W.** (2008). Environmental heterogeneity and morphological variability in *Pisidium subtruncatum* (*Sphaeriidae*, *Bivalvia*). – *International Review of Hydrobiology*. Vol. 93. No. 2, pp. 188–199.
- Germain, L.** (1930). Fauna de France: Mollusques Terrestres et Fluviales. Vol. 21. Paris: Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles, Office central de faunistique. 897 pp.
- Gittenberger, E., Janssen, A. W., Kuijper, W. J., Kuiper, J. G. J., Meijer, T., van der Velde, G, de Vries, J. N.** (2004). De Nederlandse Zoetwatermollusken: Recente en Fossiele Weekdieren Uit Zoet En Brak Water. Leiden: Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis. 292 pp.
- Glöer, P., Meier-Brook, C.** (2003). Süswassermollusken. Hamburg: Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung. 134 S.
- Glöer, P., Zettler, M. I.** (2005). Kommentierte Artenliste der Süßwassermollusken Deutschlands. – *Malakologische Abhandlungen*. Bd. 23, S. 3–26.
- Graf, D. L.** (2007). Palearctic freshwater mussel (*Mollusca: Bivalvia: Unionoida*) diversity and the comparative method as a species concept. – *Proceedings of the Academy of the Natural Sciences of Philadelphia*. Vol. 156, No. 1, pp. 71–88.
- Guralnick, R. P.** (2005). Combined molecular and morphological approaches to documenting regional biodiversity and ecological patterns in problematic taxa: a case study in the bivalve group *Cyclocalyx* (*Sphaeriidae*, *Bivalvia*) from western North America. – *Zoologica Scripta*. Vol. 34, No. 5, pp. 469–482
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucleic Acids Symposium Series*. No. 41, pp. 95–98.
- Heard, W. H.** (1965). Comparative life histories of North American pill clams (*Sphaeriidae: Pisidium*). – *Malacologia*. Vol. 2, No. 3, pp. 381–411.
- Hinch, S. G., Bailey, R. C.** (1988). Within- and among-lake variation in shell morphology of the freshwater clam *Elliptio complanata* (*Bivalvia: Unionidae*) from south-central Ontario lakes. – *Hydrobiologia*. Vol. 157, pp. 27–32.
- Holopainen, I. J., Hanski, I.** (1979). Annual energy flow in populations of two *Pisidium* species (*Bivalvia, Sphaeriidae*), with discussion on possible competition between them. – *Archiv für Hydrobiologie*. Vol. 86, No. 3, pp. 338–354.
- Hornbach, D. J., Kurth, V. J., Hove, M. C.** (2010). Variation in freshwater mussel shell sculpture and shape along a river gradient. – *The American Midland Naturalist*. Vol. 164, No. 1, pp. 22–36.
- Horsák, M.** (2006). Habitat requirements of the Czech *Pisidium* species (*Mollusca: Bivalvia*) and possible application to bioindication. – *Verhandlungen des Internationalen Vereins für Limnologie*. Vol. 29, pp. 1767–1769.

- Kasprzak, K.** (1975). Zgrupowania małżow z rodzaju *Pisidium* sensu lato (*Bivalvia*) w różnych typach zbiornikow wodnych. – *Fragmenta Faunistica*. Tom 20, Nr. 9, str. 131–142.
- Kennard, A. S., Woodward, B. B.** (1926). Synonymy of the British non-Marine *Mollusca* (Recent and Post-Tertiary). London: Trustees of the British Museum. 447 pp.
- Korniushin, A. V., Glaubrecht, M.** (2002). Phylogenetic analysis based on the morphology of viviparous freshwater clams of the family *Sphaeriidae* (*Mollusca*, *Bivalvia*, *Veneroidea*). – *Zoologica Scripta*. Vol. 31, No. 5, pp. 415–495.
- Korniushin, A. V.** (2004). The bivalve mollusc fauna of ancient lakes in the context of the historical biogeography of the Balkan region. – *Balkan Biodiversity – Pattern and Process in the European Hotspot*. /Eds. Griffiths, H. I., Krystufek, B., Reed J. M. London. Kluwer Academic Publishers, pp. 219–241
- Killeen, I., Aldridge, D., Graham, O.** (2004). Freshwater Bivalves of Britain and Ireland. Shrewsbury: FSC Publications. 115 pp.
- Krausp, C.** (1936). Kastre-Peravalla looduskaitse kvartaali limustefauna. – *Eesti Loodus*. Nr. 3, lk 107–112.
- Kuiper, J. G. J., Wolf, W. J.** (1970). The *Mollusca* of the estuarine region of the rivers Rhine, Meuse and Scheldt in relation to the hydrography of the area. III. The genus *Pisidium*. – *Basteria*. Vol. 34, No. 1–2, pp. 1–42.
- Kuiper, J. G. J., Økland, K. A., Jørgen, K., Koli, L., von Proschwitz, T., Valovirta, I.** (1989). Geographical distribution of the small mussels (*Sphaeriidae*) in North Europe (Denmark, Faroes, Finland, Iceland, Norway and Sweden). – *Ann. Zool. Fennici*. Vol. 26, pp. 73–101.
- Kuiper, J.G.J.** (1963). Hauptzüge der Verbreitung des Genus *Pisidium* in Europa. – *Archiv für Molluskenkunde*. Vol. 92, No. 5/6, pp. 247–252.
- Kuiper, J.G.J.** (1972). Une récolte de *Pisidium* dans le Moyen Atlas. Résultats de la mission biologique au Maroc de l'Université de Gand, Belgique. – *Basteria*. Vol. 36, No. 2, pp. 189–198.
- Kuiper, J. G. J.** (1983). The *Sphaeriidae* of Australia. – *Basteria*. Vol. 47, pp. 3–52.
- Kuiper, J. G. J.** (1986). De verspreiding der *Sphaeriidae* in Nederland. – *Basteria*. Vol. 50, pp. 155–176.
- Kuiper, J. G. J.** (1993). Subgenusindeling van het geslacht *Pisidium*. – *Corresp.-blad Ned. Malac. Ver.* No. 275, pp. 150–155.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K.** (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. – *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 33, No. 7. pp. 1870–1874.
- Lee, T., Ó Foighl, D.** (2003). Phylogenetic structure of the *Sphaeriinae*, a global clade of freshwater bivalve molluscs, inferred from nuclear (ITS-1) and mitochondrial (16S) ribosomal gene sequences. – *Zoological Journal of the Linnean Society*. Vol. 137, pp. 245–260.

- Mackie, G. L., Flippance, L. A.** (1983). Intra- and interspecific variations in calcium content of freshwater *Mollusca* in relation to calcium content of the water. – *Journal of Molluscan Studies*. Vol. 49, No. 3, pp. 204–212.
- Mackie, G. L.** (1989). Tolerances of five benthic invertebrates to hydrogen ions and metals (Cd, Pb, Al). – *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 18, pp. 215–223.
- Meier-Brook, C., Mothes, G.** (1966). Die Mollusken des Stechlinsees. Berichtigungen und Ergänzungen – *Limnologica*. Vol. 4, No. 3, pp. 483–487.
- Meier-Brook, C.** (1975). Der ökologische Indikatorwert mitteleuropäischer *Pisidium*-Arten (*Mollusca, Eulamellibranchiata*). – *Eiszeitalter und Gegenwart*. Bd. 26, S. 190–195.
- Minton, R. L., Norwood, A. P., Hayes, D. M.** (2008). Quantifying phenotypic gradients in freshwater snails: a case study in *Lithasia* (*Gastropoda: Pleuroceridae*). – *Hydrobiologia*. Vol. 605, pp. 173–182.
- Odhner, N. H.** (1940). Über *Pisidien* aus Süd-Schweden. – *Arkiv Zool.* Vol. 32, No. 11, pp 1–16.
- Økland, K. A., Kuiper, J. G. J.** (1982). Distribution of small mussels (*Sphaeriidae*) in Norway with notes on their ecology. – *Malacologia*. Vol. 22, No. 1–2, pp. 469–477.
- Ortmann, A. E.** (1920). Correlation of shape and station in freshwater mussels (Naiades). *Proceedings of the American Philosophical Society*. Vol. 59, No. 4. pp. 269–312.
- Paetel, F.** (1890). Catalog der Conchylien-Sammlung von Fr. Paetel. Berlin: Verlag von Gebrüder Paetel. 256 pp.
- Piechocki, A.** (1972). Materiały do poznania mięczaków (*Mollusca*) rzeki Pasłęki. – *Fragmenta Faunistica*. Tom 10, Nr. 7, str. 121–140.
- Piechocki, A.** (1989). The *Sphaeriidae* of Poland. – *Annales Zoologici*. Vol. 42, No. 12, pp. 249–320.
- Preston, S. J., Harrison, A., Lundy, M., Roberts, D., Beddoe, N., Rogowski, D.** (2010). Square pegs in round holes – the implications of shell shape variation on the translocation of adult *Margaritifera margaritifera*. – *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. Vol. 20, pp. 568–573.
- R Core Team** (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [WWW] <http://www.R-project.org/>. (11.03.17)
- Saunders, J. F., Kling, G. W.** (1990). Species distributions and shell characteristics of *Pisidium* (*Mollusca: Bivalvia*) in the Colorado Front Range: the role of abiotic factors. – *Freshwater Biology*. Vol. 24, pp. 275–285.
- Sayenko, E. M., Pearce, T. A., Shea, E. K.** (2005). Glochidial morphology of selected species of the genera *Cristaria* Schumacher, 1817 and *Sinanodonta* Modell, 1945 (*Bivalvia: Unionidae*) from Far Eastern Russia. – *American Malacological Bulletin*. Vol. 20, No. 1, pp. 11–21.
- Sergeeva, I. S., Bolotov, I. N., Bespalaya, Yu. V., Makharov, A. A., Bukhanova, A. L., Artamonova, V. S.** (2008). Freshwater pearl mussels of the genus *Margaritifera* (*Mollusca*:

Bivalvia) described as *M. elongata* (Lamarck, 1819) and *M. borealis* (Westerlund, 1871) should be classified with *M. margaritifera* (Linnaeus, 1758). – *Biology Bulletin*. Vol. 35, No. 1, pp. 102–105.

- Shapiro, S. S., Wilk, M. B.** (1956). An analysis of variance test for normality (complete samples). – *Biometrika*. Vol. 52, No. 3/4, pp 591–611.
- Schultheiß, R., Albrecht, C., Bößneck, U., Wilke, T.** (2008). The neglected side of speciation in ancient lakes: Phylogeography of an inconspicuous mollusc taxon in lakes Ohrid and Prespa. – *Hydrobiologia*. Vol. 615, No. 1, pp. 141–156.
- Shikov, E. V., Zatravkin, M. N.** (1991). The comparative method of taxonomic study of *Bivalvia* used by Soviet malacologists. – *Malakologische Abhandlungen*. Vol. 15, No. 17, pp. 149–159.
- Stelfox, A. W.** (1918). The *Pisidium* fauna of the Grand Junction Canal in Herts and Bucks. – *The Journal of Conchology*. Vol. 15, No. 10 pp. 289–318.
- Šivickis, P.** (1960). Lietuvos moliuskai ir jų apibūdinimas. Vilnius: Valstybinė Politinės ir Mokslinės Literatūros Leidykla. 352 psl.
- Zettler, M. I., Glöer, P.** (2008). Zur Ökologie und Morphologie der *Sphaeriidae* der Norddeutschen Tiefebene. – *Heldia*. Bd. 6, Sonderheft 8, S. 1–61
- Timm, T., Kangur, K., Timm, H., Timm, V.** (1994). Responses of the macrozoobenthos to waterblooms in the eutrophied brown-water Lake Valguta Mustjärv, South Estonia. – *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Ecology*. Vol.4, No. 1, pp. 21–32.
- Timm, V.** (1975). The *Pisidiinae* and the *Euglesinae* of the Lake Võrtsjärv. – *Productivity of Estonian Water Bodies*. /Eds. T. Frey et al. Estonian Contributions to the International Biological Programme. Vol. 6. Tartu: ENSV TA, pp. 201–261.
- Timm, V.** (1976). On the *Pisidiidae* of Lake Peipsi-Pihkva. – *Eesti NSV Teaduste Akadeemia Toimetised: Bioloogia*. Vol. 25, No. 1, pp. 37–52.
- van Benthem Jutting, W. S. S.** (1947). Lijst van Gemeenten als Vindplaatsen van Nederlandsche Mollusken door. – *Basteria*. Vol. 11, No. 1, 2, 3, pp. 54–87.
- Vaughn, C. C., Hakenkamp, C. C.** (2001). The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. – *Freshwater Biology*. Vol. 46, pp. 1431–1446.
- Voode, M.** (2017). Taxonomic status of *Pisidium amnicum* (Müller, 1774) and *P. inflatum* Megerle von Mühlfeld in Porro, 1838 (*Mollusca: Bivalvia: Sphaeriidae*). – *Ruthenica*. Vol. 27, No. 1, pp. 39–49.
- Voroshilova, I. S.** (2013). Are the contours of the frontal section of shell valves in *Bivalvia* specific? – *Biology Bulletin*. Vol. 40, No. 3, pp. 289–296.
- Westerlund, C. A.** (1890). Katalog der in der Paläarktischen Region lebenden Binnenconchylien. Karlshamn: E.G. Johansson's Buchdruckerei. 128 pp.
- Woodward, B. B.** (1913). Catalogue of the British Species of *Pisidium* (Recent & Fossil) in the British Museum (Natural History), With Notes on Those of Western Europe. London: Trustees of the British Museum. 144 pp.

- Александров, Б. М.** (1975). Двустворчатые моллюски озер Карелии. – *Фауна озер Карелии. Беспозвоночные*. Москва; Ленинград: Наука. С. 96-110
- Алимов, А. Ф.** (1981). Функциональная экология пресноводных двустворчатых моллюсков. Ленинград: Наука, Ленинградское отделение. 96 с.
- Болотов, И. Н., Махров, А. А., Беспалая, Ю. В., Вихрев, И. В., Аксенова, О. В., Аспхольм, П. Э., Гофаров, М. Ю., Островский, А. Н., Попов, И. Ю., Пальцер, И. С., Рудзите, М., Рудзитис, М., Ворошилова, И. С., Соколова, С. Е.** (2013). Итоги тестирования компаративного метода: кривизна фронтального сечения створки раковины не может служить систематическим признаком у пресноводных жемчужниц рода *Margaritifera*. – *Известия РАН. Серия биологическая*. Вып. 2, с. 245–256
- Богатов, В. В.** (2014). Есть ли будущее у компаративного метода при диагностике крупных двустворчатых моллюсков (*Bivalvia: Unionida*)? – *Известия РАН. Серия биологическая*. Вып. 3, с. 309–320.
- Жадин, В. И.** (1933). Пресноводные моллюски СССР. ОГИЗ, Ленснбтехиздат. 232 с.
- Жадин, В. И.** (1952). Моллюски пресных и солоноватых вод СССР. Москва: Зоологический институт Академии Наук СССР. 376 с.
- Загравкин, М. Н., Богатов, В. В.** (1987). Крупные двустворчатые моллюски пресных и солоноватых вод Дальнего Востока СССР. Владивосток: Биолого-почвенный институт Академии Наук СССР. 153 с.
- Кантор, Ю. И., Сысоев, А. В.** (2005). Каталог моллюсков России и сопредельных стран. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 627 с.
- Корнюшин, А. В.** (1990). Таксономическая ревизия и филогения рода *Euglesa s. lato (Bivalvia, Euglesidae)*. – *Зоологический журнал*. Том 69, вып. 7, с. 42–54.
- Корнюшин, А. В.** (1996). Двустворчатые моллюски надсемейства *Pisidioidea* Палеарктики. Киев: Института зоологии им. И.И. Шмальгаузена НАН Украины. 175 с.
- Корнюшин, А. В.** (2002). О видовом составе пресноводных двустворчатых моллюсков Украины и стратегии их охраны. – *Вестник зоологии*. Том 36, вып. 1, с. 9–23.
- Логвиненко, Б. М., Старобогатов, Я. И.** (1971). Кривизна фронтального сечения створки как систематический признак у двустворчатых моллюсков. – *Биологические науки*. Том 5, с. 7–10.
- Пирогов, В. В., Старобогатов, Я. И.** (1974). Мелкие двустворчатые моллюски семейства *Pisidiidae* ильменя Большой Карабулак в дельте Волги. – *Зоологический журнал*. Том 53, вып. 3, с. 325–337.
- Стадниченко, А. П.** (1984). Фауна України. Моллюски. Перлівницеві, кулькові (*Unionidae, Cycladidae*). Том 29, вип. 9. Київ: Наукова Думка. 383 с.
- Старобогатов, Я. И., Прозорова, Л. А., Богатов, В. В., Саенко, Е. М.** (2004). Моллюски, Полихеты, Немертины. – *Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий*. /Ред. С. Я. Цалолыхин. Том 6. Санкт-Петербург: Наука. 528 с.

- Старобогатов, Я. И., Стрелецкая, Э. А.** (1967). Состав и зоогеографическая характеристика пресноводной малакофауны восточной Сибири и Севера Дальнего Востока. – *Труды Зоологического института Академии Наук СССР: Моллюски и их роль в биоценозах и формировании фаун.* /Ред. Я. И. Старобогатов. Том 42. Ленинград: Наука, с. 221–268.
- Старобогатов, Я. И.** (1977). Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР. Ленинград: Гидрометеиздат. 512 с.
- Тимм, В. Я.** (1979). Значение моллюсков в зообентосе озер Псковско-Чудское и Выртсъярв. (Диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук). Ленинград.
- Тимм, В. Я.** (1984). Малакофауна некоторых водоемов Эстонии. – *Биологические особенности малых озер Эстонии.* /Сост. К. Кангур. Таллин: Академия Наук Эстонской ССР, с. 41–59.

ON THE SYSTEMATICS OF SOME ESTONIAN PEA CLAMS (*BIVALVIA: SPHAERIIDAE: PISIDIUM SPP.*)

Summary

Pea clams are some of the most widespread species living in the bottom sediment of freshwater. They are amongst the smallest of the molluscs with the length up to 11 mm. Pea clams are hermaphroditic and viviparous. They have an important role in the freshwater ecosystem as they release nutrients from the sediment and enrich the sediment with oxygen via bioturbation.

There are great differences in the systematics of pea clams between European and Russian malacological schools. In Europe, the pea clams are mostly considered as a single genus *Pisidium* Pfeiffer, 1821, but in Russia they are treated as two families *Pisidiidae* Gray in Turton, 1857 and *Euglesidae* Pirogov et Starobogatov, 1974. In Russian system the species are separated mostly by the shape of hinge teeth and by comparing the outer contour of the shell frontal section.

Pea clams are morphologically highly variable and therefore there are described many species, forms and varieties, many of which are later considered as synonyms. Amongst the most variable species are *Pisidium casertanum* (Poli, 1791) and *P. nitidum* Jenyns, 1832. Their most known forms are *P. casertanum* f. *ponderosa* Stelfox, 1918 and *P. nitidum* f. *crassa* Stelfox, 1918, which differ from the typical forms by wider and taller shell. These forms have also been considered as separate species by many authors.

The aim of the current study was to clarify if the forms *ponderosa* and *crassa* are independent species. In this purpose I compared morphometrical data, shell frontal section contour and COI gene. Hypotheses: forms *ponderosa* and *crassa* differ from their typical forms 1) morphometrically, 2) by frontal section contour, 3) are separate species according to COI gene.

According to the morphometrical analyses, *P. casertanum* differs from *P. casertanum* f. *ponderosa* by height to length ratio (K/P), width to length ratio (L/P), width to height ratio (L/P), commissural height to shell height ratio (KMK/K), distance of the umbo from the shell posterior part to shell length ratio (KK/P), width of the hinge plate to shell height ratio (LL/K). Ratio of the length of the hinge to total shell length (LP/P) and width of ligament pit to length of ligament pit ratio (LSL/LSP) were not statistically significantly different. The shell frontal section contour did not differ significantly between *P. casertanum* and *P. casertanum* f. *ponderosa*, therefore this method is inapplicable for distinguishing these two forms. Sequencing was successful for two *P. casertanum* f. *ponderosa* specimens but not for the typical form of *P. casertanum*. COI gene sequences of form *ponderosa* did not differ significantly from the sequences of the typical form obtained from GenBank.

Pisidium nitidum and *P. nitidum* f. *crassa* differed statistically significantly by all studied morphometric ratios. The shell frontal section contour was different between *P. nitidum* and *P. nitidum* f. *crassa*, therefore this contour can be used as a characteristic for distinguishing these two forms. Sequencing was successful for one specimen of *P. nitidum* typical form but not for *P. nitidum* f. *crassa*, therefore the genetic independence of *P. nitidum* f. *crassa* cannot be confirmed.

In conclusion, there is no significant differences between *P. casertanum* typical form and form *ponderosa* in genetic characteristics and shell frontal section contour. There were significant differences between these forms in shell morphometric indices but this can be caused by different habitats. *Pisidium nitidum* and *P. nitidum* f. *crassa* differed significantly from each other by shell morphometric indices as well by the frontal section contour. To confirm the genetic independence of *P. nitidum* f. *crassa*, the genetic sequences of this form needs to be determined in future studies. Also it is necessary to analyse the remaining pea clam forms from Estonia using comparative methods to determine their systematic status.

Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Margus Voode,
sünniaeg 12.06.1983

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö „Mõnede Eesti herneskarpid (Bivalvia: Sphaeriidae: Pisidium spp.) süstemaatikast“, mille juhendaja on bioloogiadoktor Tarmo Timm,

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

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.

Lõputöö autor

(allkiri)

Tartu, 19.05.2017

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)