



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

## **Onko Suomessa *Ortholimnobium handelii* -sammallajia?**

Olivia Lahtinen

Biologia (ekologia ja evoluutiobiologia)

LuK-tutkielma

Laajuus: 8 op

16.4.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu  
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Biologia

**Tekijä:** Olivia Lahtinen

**Otsikko:** Onko Suomessa *Ortholimnobium handelii* -sammallajia?

**Ohjaaja:** Sanna Huttunen

**Sivumäärä:** 14 sivua + liitteet 3 sivua

**Päivämäärä:** 16.4.2025

---

Kesällä 2023 Utsjoelta Kevon kanjonista kerättiin sammalnäyte, jonka lajinmääritys oli hankalaa pelkän morfologian perusteella. Näyte ei vaikuttanut olevan mikään Suomessa esiintyvistä sammalista, mutta sen arveltiin olevan mahdollisesti *Ortholimnobium handelii*. Tätä harvinaista ja huonosti tunnettua lajia ei ole aikaisemmin tavattu Suomessa. Lajin lähimmässä vahvistetussa esiintymispaikassa Itä-vallassa lajin tiedetään kasvavan humuspitoisilla alueilla ja suosivan kasvupaikkanaan myös kallion onkaloita. Suomesta kerätyn näytteen kasvupaikka vastaa tätä kuvausta. Tutkittava näyte eroaa kuitenkin morfologialtaan myös *O. handelii* -lajista jonkin verran. Tutkielmani tavoite on selvittää kerätyn näytteen laji DNA-sekvenssin emäsjärjestykseen perustuvan fylogeneettisen analyysin avulla. Kerätyistä näytteistä eristettiin DNA:ta, josta monistettiin tuman ITS-alue ja plastidin rpl16-alue. Tämän jälkeen monistettujen sekvenssien emäsjärjestys selvitettiin. Tein sekvensoidulle ITS-sekvenssille BLAST-haun geenipankissa, ja tallensin eniten tutkittavaa sekvenssiä vastaavat sekvenssit. Tallensin geenipankista myös aiemmissa tutkimuksissa tuotettuja laakasammalten sukuun kuuluvien sammalien ITS- ja rpl16-sekvenssejä analyysia varten. Linjasin tallentamani sekvenssit ja tein tämän jälkeen linjatuille sekvensseille parsimonia-analyysin. Analyysin tuloksena sain ITS- ja rpl16 -sekvensseihin perustuvat fylogeniapuut, ja lisäksi molempiin sekvensseihin perustuvan yhdistetyn puun. Puista näkee analyysissa mukana olleiden sammalnäytteiden sukulaisuussuhteet, ja laskin puiden ryhmille myös tukiarvot. Vertasin tutkittavan näytteestä, *O. handelii* -tyypinäytteestä ja kourulaakasammal (*Plagiothecium cavifolium*) näytteestä tehtyjen vesipreparaattien morfologiaa mikroskoopilla ja otin samalla kuvia lajinmäärityksessä tärkeistä rakenteista. Lisäksi mittasin näytteiden solujen kokoja. BLAST-haun ja fylogeneettisen analyysin perusteella tutkittava näyte vaikuttaa olevan kourulaakasammal. Näyteyksilö muodostaa monofyleettisen ryhmän kyseisen lajin muiden näytteiden kanssa. Morfologialtaan näyteyksilö kuitenkin eroaa tyypillisestä kourulaakasammalesta. Poikkeava morfologia voi olla seurausta tutkittavan näytteen kasvupaikan ympäristötekijöistä, esimerkiksi vähäisestä valosta. DNA-menetelmät voivat siis olla tärkeä apu sammalten lajinmäärityksessä.

---

**Avainsanat:** DNA-viivakoodaus, fylogenia, lajinmääritys, morfologia, Plagiothecium

## Sisällys

<b>1</b>	<b>Johdanto.....</b>	<b>1</b>
1.1	Tutkimusaineisto .....	1
1.2	Tutkimuksen tavoite .....	2
<b>2</b>	<b>Aineisto ja menetelmät .....</b>	<b>3</b>
2.1	DNA eristys, monistus ja sekvensointi.....	3
2.2	BLAST-haku.....	4
2.3	Sekvenssien linjaus ja fylogeneettinen analyysi.....	5
2.4	Morfologian vertailu .....	5
<b>3</b>	<b>Tulokset.....</b>	<b>6</b>
3.1	BLAST-haku ja fylogeneettinen analyysi.....	6
3.2	Morfologia.....	10
<b>4</b>	<b>Tulosten tarkastelu .....</b>	<b>11</b>
	<b>Kiitokset .....</b>	<b>12</b>
	<b>Lähteet.....</b>	<b>13</b>
	<b>Liitteet</b>	

# 1 Johdanto

## 1.1 Tutkimusaineisto

Utsjoelta Kevon kanjonista kerättiin kesällä 2023 sammalnäyte

(<http://mus.utu.fi/TBR.127714>), joka näytteen kerääjän Timo Kypärän mukaan ei vaikuttanut olevan mikään Suomessa esiintyvistä sammallajeista vaan mahdollisesti *Ortholimnobium handelii* (Broth.) J.T. Wynns & C. Schröck. Tästä syystä sammalnäyte lähetettiin Turun yliopiston kasvimuseolle tarkempaa tutkimusta varten. Sanna Huttunen vertasi näytettä *O. handelii* -lajin tyyppinäytteeseen ja havaitsi sekä samankaltaisuuksia että eroja. Muun muassa lehti- ja solukkotuntomerkit vastaavat *O. handelii* -lajin kuvausta, mutta verson rakenne ja kasvutapa eroavat hiukan (Sanna Huttunen, suullinen tiedonanto).

*Ortholimnobium handelii* on harvinainen ja huonosti tunnettu kylkipesäkkeinen sammal-laji. Alun perin Brotherus (1929) kuvasi lajin Kiinasta kerätyistä näytteistä, ja sitä on myöhemmin löydetty muun muassa Itävallasta ja Yhdysvalloista. Itävallassa lajin kuvataan kasvavan humuspitoisilla alueilla, kosteilla ja kuusivaltaisilla rinteillä. Laji suosii myös pieniä onkaloita kasvupaikkanaan (Wynns ja Schröck 2018). Laji on pienikokoinen, ja sen keskisuo-nettomat lehdet ovat koverat ja muodoltaan soikeanpyöreät (Kuva 1 A). Lajin kuvataan kasvavan rihmamaisesti maanmyötäisesti, ja haarovan niukasti. (Wynns ja Schröck 2018). Laji kuului ennen laakasammalten sukuun (*Plagiothecium*), mutta Wynns ja Schröck siirsivät sen *Ortholimnobium*-sukuun.

*Ortholimnobium handelii* -lajia ei ole aiemmin tavattu Suomessa (Pihlaja ym. 2024), mutta sen esiintyminen täällä on mahdollista. Suomesta kerätyn näytteen kerrotaan kasvaneen pienessä onkalossa kivialustalla (Timo Kypärä suullinen tiedonanto), eli kasvupaikan olosuhteet vastaavat ainakin osin *O. handelii* -lajin vahvistettuja mahdollisia kasvupaikkoja. Suomi kuuluu havumetsävyöhykkeeseen, ja monia Suomessa tavattuja sammallajeja tavataan pohjoisen pallonpuoliskon havumetsävyöhykkeellä myös Pohjois-Amerikassa ja muualla Euraasiassa. Etelään mentäessä havumetsävyöhyke keskittyy vuoristoihin (Ulvinen ym. 2002), ja ainakin Itävallasta ja Kiinasta peräisin olevat *O. handelii* -näytteet on kerätty vuoristosta (Wynns ja Schröck 2018), mikä edelleen lisää mahdollisuutta sille, että lajia voisi löytyä myös Suomesta.



Kuva 1. A) Wynnsin ja Schröckin (2018) tutkimusartikkelin kuvat *Ortholimnobia handelii* (Broth.) J.T. Wynns & C. Schröck -lajin lehdistä, B) kourulaakasammalen (*Plagiothecium cavifolium* (Brid.) Z. Iwats) (näyte TUR123200) lehti, C) tutkittavan näytteen (näyte TUR127714) lehti. Kuvan A mittakaava on 1 mm, kuvan B mittakaava on 500  $\mu$ m ja kuvan C mittakaava on 200  $\mu$ m.

## 1.2 Tutkimuksen tavoite

Kandidaatintutkielmani tavoite on määrittää Suomesta kerätyn sammalnäytteen laji DNA-sekvenssiaineistoa apuna käyttäen. Koska lajinmääritys ei ollut mahdollista pelkän morfologian avulla, käytän lajin määrittämiseen tietoa näytteen DNA:n emäsjärjestyksestä eli DNA-sekvenssistä. Vertaan tutkittavasta näytteestä sekvensoitujen DNA-alueiden emäskoostumusta geenipankkiin (GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) tallennettuihin sammalsekvensseihin, ja testaan näytteen sukulaisuussuhdetta muihin laakasammalten suvun lajeihin fylogeneettisen analyysin avulla. Käytän tutkimuksessani apuna Wynnsin ja Schröckin (2018) *O. handelii* -lajia koskevaan tutkimukseen tuottamia DNA-sekvenssejä. He tekivät fylogeneetti-

sen analyysin *O. handelii* -lajille ja muille tälle läheisesti sukua oleville sammallajeille, ja sekvenssit löytävät geenipankista. Lisäksi saan tutkimuksesta kuvauksen *O. handelii*-lajin morfologiasta ja lajin kasvupaikoista.

Kun olen saanut tutkittavan näytteen lajin selville fylogeneettisen analyysin avulla, vertaan näytteen morfologiaa tarkemmin fylogenenian perusteella paljastuneisiin lähisukuisiin lajeihin muun muassa ottamalla kuvia mikroskoopilla. Tutkin morfologiaa uudestaan, sillä DNA-sekvenssiaineistoon perustuva tieto näytteen lähisukulaisista voi auttaa etsimään aiemmin huomaamatta jääneitä morfologisia ominaisuuksia. Tämä voi mahdollisesti antaa viitteitä siitä, mikä ympäristö- tai muu tekijä on voinut aiheuttaa näytteen poikkeavan morfologian. Vertailussa keskityn tutkittavan näytteen lähisukulaisten ja *O. handelii* -lajin lajintunnistuksessa yleisesti käytettyihin solu- ja lehtituntomerkkeihin.

## 2 Aineisto ja menetelmät

### 2.1 DNA eristys, monistus ja sekvensointi

Suomesta kerätystä näytteestä oli jo aikaisemmin eristetty DNA:ta Turun yliopiston kasvimuseolla (Sanna Huttunen, DNA-eristys SH2027). DNA:n eristyksessä käytettiin kaupallista valmista NucleoSpin Plant II DNA -eristyskittiä (E.Z.N.A). Eristys tehtiin sammalnäytteen yhdestä versosta. Näytteestä oli myös aiemmin monistettu tuman ITS-alue käyttäen PCR-menetelmää. Monistamiseen käytettiin kaupallista Illustra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads -kittiä (Cytiva), jossa PCR-reaktiossa tarvittavat entsyymit ovat putkissa valmiina helminä. Näiden lisäksi putkiin laitettiin 1 µl monistettavaa DNA:ta eli templaatti-DNA:ta, 22 µl vettä, sekä 1 µl kahta eri aluketta. ITS-alueen monistuksessa käytetyt alukkeet olivat ITS4\_bryo (TCCTCCGCTTAGTGATATGC) ja ITS5\_bryo (GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG) (Stech ja Frahm 1999). PCR-ohjelmaan kuului denaturaatio (94°C 2 min) ja 40 sykliä (93°C 1 min, 50°C 1 min, 68°C 45 s) ja lopuksi 72°C:ssa 10 min.

Monistin lisäksi eristetystä DNA:sta plastidin rpl16-alueen. Käytin samaa kittiä, mitä käytettiin ITS-alueen monistamiseen. Rpl16-alueen monistuksessa käytin alukkeita F71(GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG; Jordan ym. 1996) ja antR2 (GGTTTCTTTCATCCGGCTTCTCA; Hedenäs ja Eldenäs 2007), joita kumpaakin laitoin

1 µl. Lisäksi laitoin putkiin 19 µl vettä sekä 4 µl monistettavaa DNA:ta. PCR-ohjelmaan kuului alun denaturaatio (96 °C 7 min) ja 40 sykliä (96°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1,5 min) ja lopuksi 72 °C:ssa 8 min. ITS ja rpl16 valikoituivat monistettaviksi sekvensseiksi, koska Wynns ja Schröck (2018) olivat käyttäneet niitä tutkimuksessaan, jota käytin oman tutkimukseni pohjana, ja pystyin näin vertaamaan tutkittavan näytteen sekvenssejä helposti heidän tuottamiinsa sekvensseihin.

Varmistin DNA:n monistuksen onnistumisen geelielektroforeesilla. Käytin 1 % agarosigeeliä, puskuriliuosta ja väriainetta, joka tekee DNA:n näkyväksi UV-valossa. Onnistuneesti eristetty ja monistettu DNA-näyte lähetettiin MacroGen Inc -yritykseen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com), Etelä-Korea), jossa näyte sekvensoitiin, eli selvitettiin DNA:n emäsjärjestys. Tarkistin sekvensoinnin tuloksena saadun fasta-muotoisten sekvenssin oikeellisuuden vertaamalla fastatiedostoa sekvensointilaitteen tuottamaan kromatogrammi-tiedostoon. Tämän vaiheen tein Phyre-ohjelmassa (Müller ym. 2005; [www.phyre.de](http://www.phyre.de)).

## 2.2 BLAST-haku

Tein sekvensoidulle sekvenssille BLAST-haun (The Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul ym. 1990) geenipankissa. BLAST vertaa tutkittavaa sekvenssiä muihin geenipankissa oleviin sekvensseihin ja etsii niiden välisiä samankaltaisuuksia. Haku antaa listan sekvensseistä, ja suurimman samankaltaisuuden omaavat sekvenssit ovat listan ensimmäisinä. Tein BLAST-haun ainoastaan ITS-sekvenssille. Tallensin kuusi eniten tutkittavaa sekvenssiä vastaavaa sekvenssiä (Taulukko 1). Yksi ensimmäisestä kuudesta sekvenssistä oli sama kuin Schröckin ja Wynnsin tutkimusartikkelissa (2018), joten korvasin sen seitsemänneksi suurimman vastaavuuden omaavalla sekvenssillä. Lisäksi etsin geenipankista Schröckin ja Wynnsin tutkimuksessa käytetyt ITS-sekvenssit niiden geenipankin tunnisteella ja tallensin ne samaan tiedostoon BLAST-haun sekvenssien kanssa. Etsin myös artikkelissa esitetyt rpl16-sekvenssit niiden tunnisteella geenipankista, ja tallensin ne omaan tiedostoon. Lisäksi tein yhdistetyn tiedoston rpl16- ja ITS-sekvensseille, pois lukien BLAST-haussa saadut sekvenssit (Taulukko 2).

## 2.3 Sekvenssien linjaus ja fylogeneettinen analyysi

Tallennettuani geenipankista tarvitsemiä sekvenssejä, linjasin ne, eli asetin eri sekvenssien samaksi oletetut emäkset kohdakkain. Tein omat linjaukset ITS- ja rpl16- sekvensseille. Tein linjauksen manuaalisesti käyttäen Phyde-ohjelmaa. ITS-sekvenssin linjaus koostui 35:tä sekvenssistä, joista yksi oli tutkittava sekvenssi ja loput olin etsinyt geenipankista (Taulukot 1 ja 2). Koska rpl16- alueen sekvenssit olivat hankalia linjata manuaalisesti, tein rpl16-alueen linjauksen ensin automaattisesti MAFT-ohjelmalla (Madeira ym. 2024), mutta muokkasin tätä linjausta vielä manuaalisesti Phyde-ohjelmalla. Rpl16-sekvenssin linjaus sisälsi tutkittavan sekvenssin ja 22 geenipankista haettua sekvenssiä (Taulukko 2).

Varsinaista fylogeneettista analyysiä varten tallensin linjausohjelmassa tekemäni tiedostot NEXUS-muodossa ja syötin ne TNT-ohjelmaan (Goloboff ja Morales 2023). Tein TNT-ohjelmalla sekvenssiaineistoon perustuvan parsimonia-analyysin käyttäen New Technology Search -hakua. Parsimonia-analyysi pyrkii etsimään mahdollisimman yksinkertaisen puun, eli sellaisen, jossa on tapahtunut mahdollisimman vähän evolutiivisia emäsmuutoksia sekvenssien välillä. Tein omat puut ITS- ja rpl16- sekvensseille, ja lisäksi tein molempien sekvenssien sisältäviin emäseroihin perustuvan yhdistetyn puun. Tein TNT:n yhdistetyn aineiston analyysissä löytyneiden puiden perusteella yhden konsensuspuun. Konsensuspuussa yhdistyy ne ominaisuudet, jotka olivat kaikissa parsimonia-analyysissä löydettyissä puissa. Lisäksi lasin puiden ryhmille jackknife-tukiarvot. Tukiarvo kertoo, kuinka suuressa osassa luoduista puista kyseinen ryhmä esiintyy.

Loin TNT:n tulosten perusteella visuaalisen fylogeniapuun käyttäen FigTree-ohjelmaa (Rambaut 2018). Puusta ilmenee tutkittavan sammalnäytteen sukulaisuussuhteet ja puussa esiintyvien ryhmien tukiarvot.

## 2.4 Morfologian vertailu

Laakasammalten lajinmäärityksessä tärkeitä rakenteita ovat muun muassa lehtien ja solujen koko ja muoto, sekä lehden johteiden rakenne. Morfologiaa vertailllessani tarkastelin näitä ra-

kenteita, ja tätä varten vertailtavista sammalnäytteistä tehtiin vesipreparaatit. Preparaatit tehtiin tutkittavasta sammalnäytteestä (<http://mus.utu.fi/TBR.127714>), *Ortholimnobium handelii* -tyyppinäytteestä (<http://id.luomus.fi/HA.H3112711>), sekä fylogeneettisen analyysin tulosten perusteella tutkittavan näytteen kanssa samaa lajia olevasta sammalnäytteestä (<http://mus.utu.fi/TBR.123200>). Käytin preparaattien teossa apuna OlympusSZX9 preparointimikroskooppia.

Preparaateista otettiin kuvia OlympusBX53 valomikroskoopin avulla. Jokaisesta näytteestä otettiin kuvat koko lehdestä, lehden johteista, sekä lehden soluista. Kuvat otettiin joko 20- tai 40-kertaisella suurennoksella ja noin 15 kappaletta yhdestä rakenteesta. Zerene Stacker -ohjelmalla (<https://www.zereneystems.com>) kuvat yhdistettiin kerroskuvaksi (Kuvat 1 ja 3). Kuvien ottamisen yhteydessä mittasin myös lehtien soluja. Mittasin jokaisen näytteen viidestä lehdestä kahden lehden keskivaiheilla olevan solun pituuden ja leveyden. Kirjasin mitat ylös Excel-tiedostoon ja laskin leveyksille ja pituuksille keskiarvot ja keskihajonnat (Liite 1). Vertasin näitä kirjallisuudessa annettuihin mittoihin.

## 3 Tulokset

### 3.1 BLAST-haku ja fylogeneettinen analyysi

BLAST-haun mukaan tutkittavan näytteen vastaavuus Wynnsin ja Schröckin (2018) tutkimuksessa kourulaakasammalista (*Plagiothecium cavifolium* (Brid.) Z. Iwats) sekvensoituihin ITS-sekvensseihin on 99,31 % (näyte Wynns 2960, Taulukko 2) ja 99,40 % (Wynns 3313, Taulukko 2). Vastaavuudet samoista näytteistä sekvensoituihin rpl16-sekvensseihin on 99,56 % (näyte Wynns 2960, Taulukko 2) ja 97,13 % (Wynns 3313, Taulukko 2). Lisäksi BLAST-haku löysi 99,31 % vastaavuuden kourulaaksammalen ITS-sekvenssiin, jonka geenipankin hakutunniste on KF882225.1 (Taulukko 1). Vastaavuus *Ortholimnobium handelii* -näytteistä sekvensoituihin ITS-sekvensseihin on 96,32 % (Long 34930, Taulukko 2) ja 97 % (Schröck 17477, Taulukko 2). Näytteistä sekvensoituihin rpl16-sekvensseihin vastaavuudet ovat 91,79 % (Long 34930, Taulukko 2) ja 94,29 % (Schröck 17477, Taulukko 2).

Taulukko 1. BLAST-haun mukaan tutkittavan näytteen ITS-aluetta parhaiten vastaavien geenipankissa olevien ITS-sekvenssien geenipankin tunnistet ja lajinimet. Näitä sekvenssejä käytin ITS-alueen fylogeneettisessä analyysissä.

Lajinimi	Tunniste
<i>Plagiothecium cavifolium</i>	KF882225.1
<i>Plagiothecium succulentum</i>	KF882244.1
<i>Plagiothecium succulentum</i>	KF882243.1
<i>Plagiothecium ruthei</i>	KF882242.1
<i>Plagiothecium platyphyllum</i>	KF882241.1
<i>Plagiothecium nemorale</i>	KF882238.1

Taulukko 2. Analyysissä käyttämäni, Wynnsin ja Schröckin (2018) tutkimusartikkelissa esitettyjen ITS- ja rpl16-sekvenssien tunnistet, lajinimet ja näytteiden keruunumerot. Nämä sekvenssit sisältyvät fylogeneettiseen analyysiin yhdessä tutkittavan sekvenssin kanssa. Näytteet, joiden kohdalla ei ole rpl16-sekvenssin tunnistetta, sisältyivät vain ITS-sekvenssien fylogeneettiseen analyysiin (Liite 2).

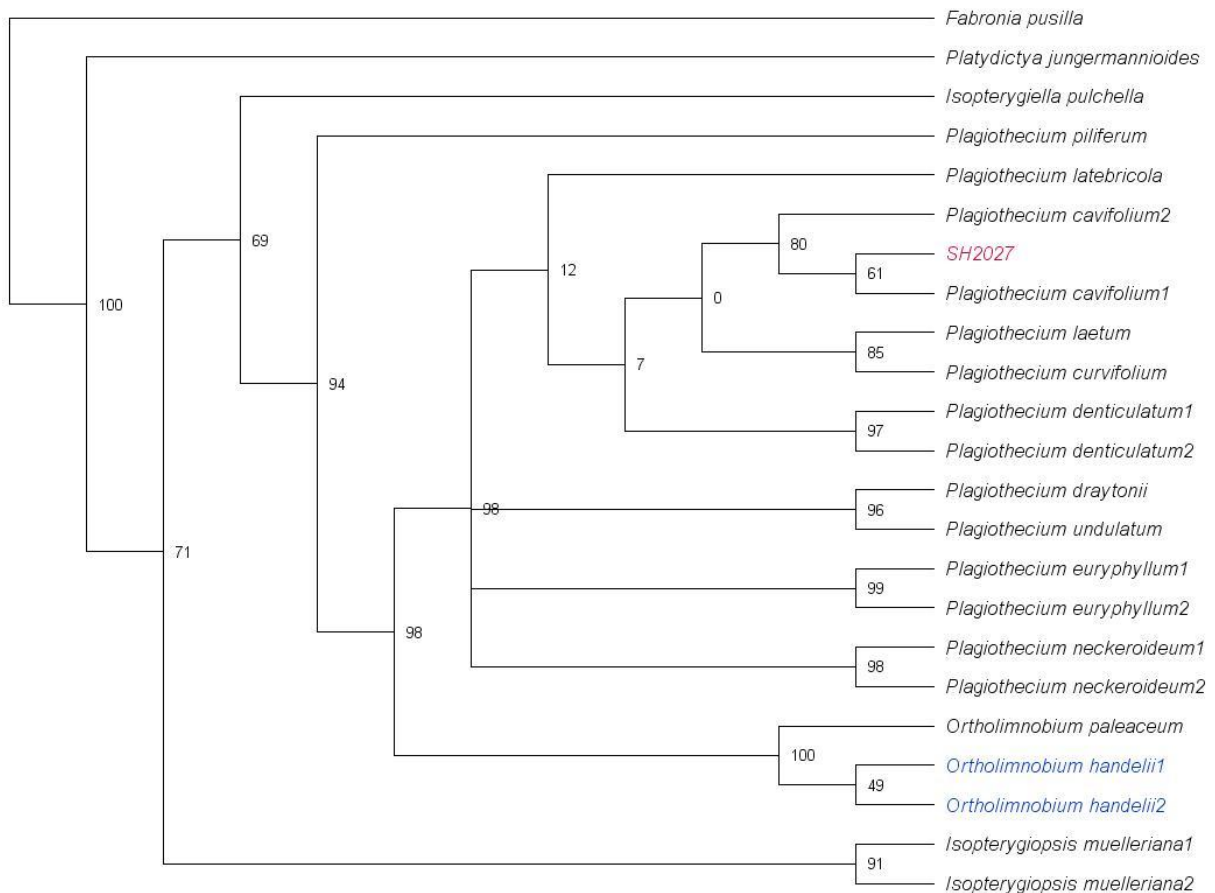
Lajinimi	Tunniste ITS	Tunniste rpl16	Keruunumero
<i>Fabronia pusilla</i>	KY550326.1	KY514032.1	Hedenäs s.n
<i>Isopterygiopsis muelleriana</i>	KF882224.1	KF882324.1	Long 38040
<i>Isopterygiopsis muelleriana</i>	KY550335.1	KY514041.1	Wynns 3404
<i>Isopterygiopsis pulchella</i>	KY550336.1	KY514042.1	Lentz 3027
<i>Plagiothecium (Ortholimnobia) handelii</i>	KF882233.1	KF882333.1	Long 34930
<i>Plagiothecium (Ortholimnobia) handelii</i>	KY550290.1	KY513995.1	Schröck 17477
<i>Plagiothecium (Ortholimnobia) paleaceum</i>	HQ665452/3.1	KY514020.1	Long 22443
<i>Plagiothecium cavifolium</i>	KF882226.1	KF882326.1	Wynns 2960

<i>Plagiothecium cavifolium</i>	KY550269.1	KY513974.1	Wynns 3313
<i>Plagiothecium curvifolium</i>	KF882227.1	KF882327.1	Wynns 1939
<i>Plagiothecium denticulatum</i>	KF882229.1	KF882329.1	Wynns 2081
<i>Plagiothecium denticulatum</i> var. <i>obtusifolium</i>	KF882230.1	KF882330.1	Wynns 2842
<i>Plagiothecium draytonii</i>	KF882231.1	KF882331.1	Hoe 3557
<i>Plagiothecium euryphyllum</i>	KY550289.1	KY513994.1	Mizutani 15227
<i>Plagiothecium euryphyllum</i>	KF882232.1	KF882332.1	Long 36218
<i>Plagiothecium laetum</i>	KF882234.1	KF882334.1	Wynns 2907
<i>Plagiothecium latebricola</i>	KF882235.1	KF882335.1	Goldberg s.n.
<i>Plagiothecium neckeroideum</i>	KY550305.1	KY514010.1	Schwarz 3783
<i>Plagiothecium neckeroideum</i> var. <i>myurum</i>	KF882236.1	KF882336.1	Shevock 26916
<i>Plagiothecium undulatum</i>	KF882245.1	KF882345.1	Wynns 2050
<i>Platydictya jungermannioides</i>	KY550338.1	KY514044.1	Shevock 32476
<i>Plagiothecium (Rectithecium) piliferum</i>	KF882240.1	KF882340.1	Shevock 26205
<i>Isopterygiopsis muelleriana</i>	KY550334.1		Frahm 2009593
<i>Isopterygiopsis alpicola</i>	KY997058.1		Mogensen 90-65
<i>Plagiothecium (Rectithecium) piliferum</i>	KY5550315.1		B.R.C.C.E 238
<i>Plagiothecium (Struckia) argentatum</i>	KY550339		Shevock 25571
<i>Plagiothecium (Struckia) enerve</i>	KY550340		Mosses of USSR 15

Tutkittava näyte (SH2027) muodostaa monofyleettisen, samasta kantamuodosta kehittyneen ryhmän kourulaakasammalen kanssa. Tämä käy ilmi molemmat sekvenssit sisältävään aineistoon perustuvasta yhdistetystä konsensuspuusta (Kuva 2), jonka loin TNT:n yhdistetyssä ana-

lyyssissä löytämien neljän samanpituisen eli yhtä hyvän puun pohjalta. Lisäksi monofyleettisyys käy ilmi erikseen sekä ITS-, että rpl16-sekvenssien pohjalta tehdyistä puista (Liitteet 2 ja 3). *Ortholimnobium handelii* -näytteet asettuvat kaikissa puissa toistensa kanssa samaan monofyleettiseen ryhmään.

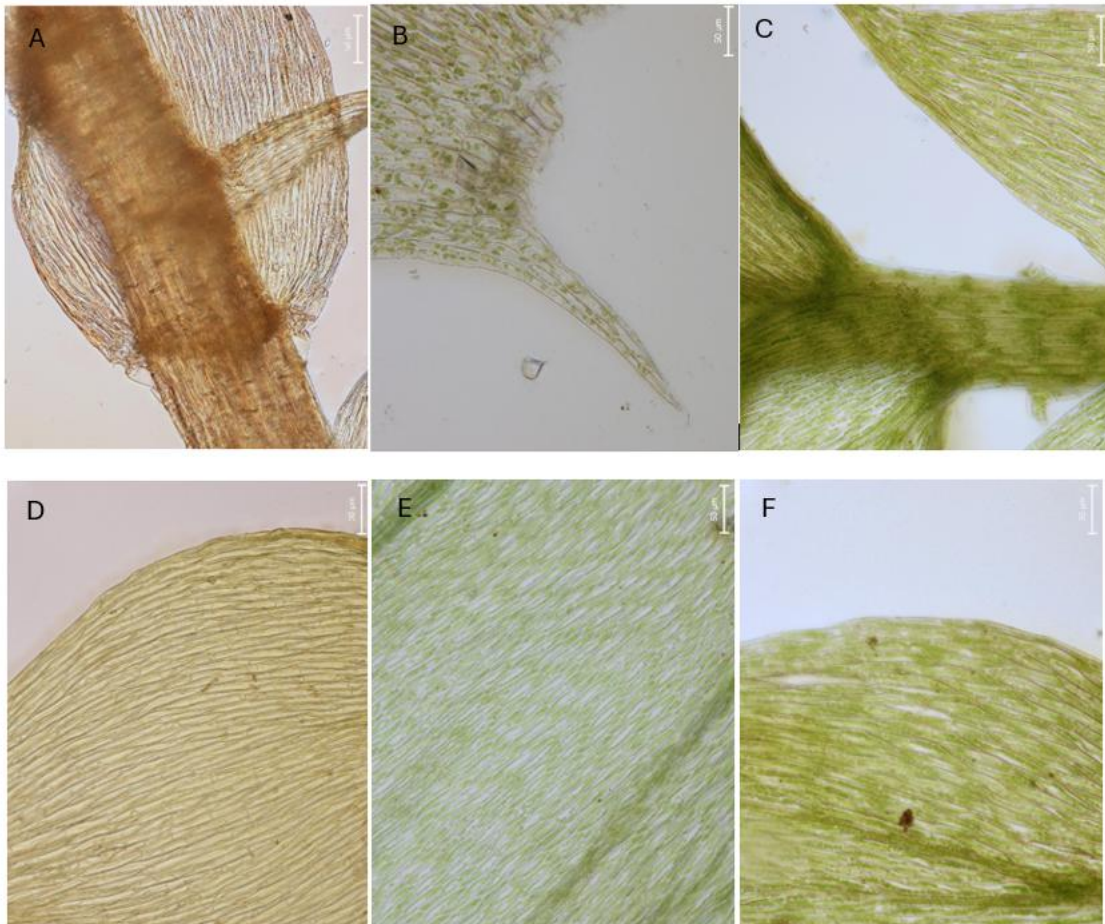
Fylogeneettisessä puussa samaan sukuun tai lajiin kuuluvien näytteiden oletetaan asettuvan samaan monofyleettiseen ryhmään. Tutkittavan näytteen ja kourulaakasammalen muodostaman monofyleettisen ryhmän tukiarvo on melko hyvä (80, Kuva 2), mutta tuki sille, että näyte kuuluu laakasammalten (*Plagiothecium*) sukuun on korkea (98, Kuva 2). Tuki *Ortholimnobium*-näytteiden muodostamalle erilliselle ryhmälle on hyvä (100, Kuva 2). Tämä kertoo siitä, että tutkittava näyte on todennäköisesti kourulaakasammal, eikä *O. handelii*.



Kuva 2. Tutkittavan näytteen (SH2027) ITS- ja rpl16-sekvenssien, ja Wynnsin ja Schröckin (2018) tutkimusartikkelissa esitettyjen ITS- ja rpl16-sekvenssien (Taulukko 2) pohjalta tehty konsensuspuu. Puusta näkee tutkittavien sammalnäytteiden sukulaisuussuhteet ja ryhmien tukiarvot.

## 3.2 Morfologia

Tutkittava näyte eroaa morfologiansa puolesta sekä *Ortholimnobium handelii* - että kourulaakasammal-näytteistä. Tutkittava näyte on kooltaan huomattavasti pienempi kuin tyypillinen kourulaakasammal tai *O. handelii*. Näytteen lehtien johteet olivat todella pienet, lähes olemattomat (Kuva 3 C). Näytteen lehtien solut olivat keskimäärin 99,9 µm pitkiä (hajonta 16,1 µm) ja 10,8 µm leveitä (hajonta 1,7 µm) (Liite 1, Kuva 3 F). Vertailussa käytetyn kourulaakasammalen solut olivat keskimäärin 69,9 µm pitkiä (hajonta 9,1 µm) ja 10,4 µm leveitä (hajonta 1,0 µm) (Liite 1, Kuva 3 E). Vertailtavan *O. handelii* -näytteen solujen pituus oli keskimäärin 79,1 µm (hajonta 5,0 µm) ja leveys 9,6 µm (hajonta 1,1 µm) (Liite 1, Kuva 3 D).



Kuva 3. Kuvia tutkimuksen sammalten lehtien johteista (A-C) ja soluista (D-F). Kuvat A ja D ovat *Ortholimnobium handelii* (Broth.) J.T. Wynns & C. Schröck (näyte HA.H3112711), kuvat B ja E ovat kourulaakasammal (*Plagiothecium cavifolium* (Brid.) Z. Iwats)) (näyte TUR123200), ja kuvat C ja F ovat tutkittava näyte (näyte TUR127714). Kaikissa kuvissa mittakaava on 50 µm.

## 4 Tulosten tarkastelu

DNA-sekvenssiaineiston perusteella tutkittava sammalnäyte on hyvin todennäköisesti kourulaakasammal, sillä se muodostaa evolutiivisessa puussa monofyleettisen ryhmän kyseisen lajin muiden näytteiden kanssa (Kuva 2). Tutkittavan näytteen ITS- ja rpl16- sekvenssien vastaavuus kyseisen lajin vastaaviin sekvensseihin on myös korkea. Aikaisempi oletus siitä, että kyseessä on *Ortholimmobium handelii*, ei siis pidä paikkaansa. Kourulaakasammalta tavataan koko Suomen alueella aina Ahvenanmaalta Inarin Lappiin asti. Se kasvaa savisella ja humuspitoisella maalla, niin kallioilla kuin kallion ja maan onkaloissa (Piippo ym. 2019). Tämä kuvaus vastaa hyvin tutkittavan näytteen kasvupaikan kuvausta.

Tutkittavan näytteen morfologia kuitenkin poikkeaa muista tyypillisistä kourulaakasammal näytteistä, ja lajinmääritys pelkän morfologian perusteella oli hyvin haastavaa. Ulkomuotonsa ja pienten lehden johteiden (Kuva 3C) perusteella tutkittava näyte muistuttaa *Ortholimmobium handelii* -lajia. Ainoa kourulaakasammaleeseen viittaava ominaisuus oli poikkeuksellisen leveät, yli 10 µm levyiset, lehtisolut, mikä ei sopinut *O. handelii* -lajin lajinkuvaukseen (Liite 1, kuva 3 F). Kourulaakasammalella lehtien johteet ovat selkeät ja niiden solut ovat pitkulaisia ja litteitä (Kuva 3 B ja E). Lehden solut ovat kooltaan 65–120 µm x 10–14 µm (Hedenäs 2014). *Ortholimmobium handelii* -lajin lehden johteet ovat pienet, johteiden solut ovat pulleita ja lehtien solut ovat alle 10 µm leveitä ((75)85–125 µm x 7,5–10 µm) (Hedenäs 2014) (Kuva 3 A ja D).

Putkilokasveihin verrattuna sammalet ovat puutteellisesti tunnettuja, ja esimerkiksi niiden morfologian plastisuudesta on vain vähän tutkimusta (Coe ym. 2023). Yksinkertaisen rakenteensa takia sammalilla on vain vähän morfologisia ominaisuuksia, joihin ympäristö voi vaikuttaa. Sammalten morfologiaan voi kuitenkin olettaa vaikuttavan samat tekijät kuin putkilokasveilla. Kasvien morfologiaan vaikuttaa muun muassa valon, veden ja ravinteiden määrä. Tutkittava sammal oli kasvanut kallion onkalossa, mikä on voinut saada aikaan epäsuotuisat kasvuolosuhteet ja näin ollen aiheuttaa poikkeavan morfologian. On mahdollista, että sammal on saanut onkalossa vain vähän valoa, mikä on vaikuttanut sen kasvuun. *Ortholimmobium handelii* -lajin kerrotaankin muistuttavan niukassa valossa kasvanutta (eng. etiolation) kourulaakasammalta (Wynns ja Schröck 2018). Tämä selittää hyvin sitä, miksi tutkittavan näytteen

morfologia poikkeaa tyypillisestä kourulaakasammalesta, ja miksi kokenut kerääjä oletti tutkittavan sammalnäytteen ensin olevan *O. handelii*.

DNA-menetelmät voivat olla hyödyksi varsinkin uhanalaisten sammallajien tunnistamisessa. Lajinmäärityksen kannalta tärkeät ominaisuudet voivat puuttua tutkittavasta näytteestä tai olla muutoin vaikeasti havaittavia. Erityisesti lähisukuisten lajien erottaminen toisistaan morfologian perusteella voi olla hankalaa (Rowntree ym. 2010). Tutkittavia näytteitä voi lisäksi olla saatavilla vain vähän. Jos tutkittava sammalnäyte olisi ollut *O. handelii*, olisi kyseessä ollut Suomelle uusi sammal, joka olisi vaatinut uhanalaisuusluokituksen. Varmuutta tutkittavan sammalnäytteen lajista ei olisi saatu ilman sekvenssidataan perustuvaa fylogeneettistä analyysia. Esimerkkinä toisen harvinaisen lajin määrittämisestä Rowntree ym. (2010) esittävät tutkimuksessaan, miten DNA-viivakoodaus oli tärkeä apu uhanalaisen *Orthodontium gracile* -lajin erottamisessa samannäköisestä, mahdollisesti haitallisesta samaan sukuun kuuluvasta *Orthodontium lineare* -vieraslajista. Lajien tarkka määrittäminen voi siis olla tärkeää lajien suojelun kannalta.

DNA-menetelmissä on kuitenkin myös haasteita. Lajinmääritys perustuu sammallajien välillä olevien geneettisten erojen määrään, ja lajinmääritys onnistuu ainoastaan silloin, kun eroja on tarpeeksi. Laakasammalten suvun sisällä vaihtelua on vain vähän (Wynns ja Lange 2014). Tässä tutkielmassa vertailtavien näytteiden välillä vaihtelua oli kuitenkin tarpeeksi ja geenipankissa oli riittävästi materiaalia luotettavaa analyysia varten. Erot lajien välillä olivat kuitenkin hyvin pieniä, vaikka ITS-sekvenssillä on suuri lajienvälinen vaihtelu (Hassel ym. 2013). Tutkittavan näytteen määrittäminen rakenteellisten tuntomerkkien avulla oli siis lähes mahdotonta, joten DNA oli kyseisen näytteen lajinmäärityksessä tärkeä apu.

## Kiitokset

Kiitos Sanna Huttuselle LuK-tutkielmani ohjaamisesta ja aiheen ehdottamisesta, sekä suuresta avusta työn eri vaiheissa. Kiitos myös Timo Kypärälle tutkittavan sammalnäytteen keräämisestä.

## Lähteet

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403-10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Brotherus, V. F. (1929) *Musci. Symbolae Sinicae* 4. – J. Springer.

Coe, K., Carter, B., Slate, M., Stanton, D. (2024) Moss functional trait ecology: Trends, gaps, and biases in the current literature. *American Journal of Botany* 111: e16288. DOI: 10.1002/ajb2.16288

Goloboff, P. A., Morales, M. E. (2023) TNT version 1.6, with a graphical interface for MacOS and Linux, including new routines in parallel. *Cladistics* 39:144–153. DOI: 10.1111/cla.12524

Hassel K., Segreto R., Ekrem T. (2013) Restricted variation in plant barcoding markers limits identification in closely related bryophyte species. *Molecular Ecology Resources* 13: 1047-1057. DOI: 10.1111/1755-0998.12074

Hedenäs, L. (2014) *Plagiothecium cavifolium* Trindsidanmossa s. 310. - Teoksessa Hedenäs, L., Reisborg, C. & Hallinbäck, T. (2014) Nationalnyckeln till Sveriges flora och fauna. Bladmossor: Skirmossor-baronmossor. Bryophyta: *Hookeria* - *Anomodon*. ArtDatabanken, SLU, Uppsala.

Hedenäs, L., Eldenäs, P. (2007) Cryptic speciation, habitat differentiation, and geography in *Hamatocalis vernicosus* (Calliergonaceae, Bryophyta). *Plant Systematics and Evolution* 268: 131 – 145. DOI: 10.1007/s00606-007-0529-y

Jordan, W. C., Courtney, M. W., Neigel, J. E. (1996) Low levels of intraspecific genetic variation at rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae). *American Journal of Botany* 83: 430 – 439. DOI: 10.2307/2446212.

Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A.R.N., Lopez, R., Butcher, S. (2024) The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research.* 52:W521-W525. DOI: 10.1093/nar/gkae241.

Müller, K., Quandt, D., Müller, J., Neinhuis C. (2005) PhyDE ® 0.983: Phylogenetic Data Editor. Saatavissa: [www.phyde.de](http://www.phyde.de)

- Pihlaja, K., Huttunen, S., Ulvinen, T., He X.-L. (2024) Sammalet – Anthocerophyta, Bryophyta, Marchantiophyta – Julkaisussa: Suomen Lajitietokeskus 2024. Lajiluettelo 2023. Suomen Lajitietokeskus, Luonnontieteellinen keskusmuseo, Helsingin yliopisto, Helsinki
- Piippo, S., Koponen, T. (2019) Suomen sammalet. Minerva Kustannus Oy, Helsinki s.121
- Rambaut, A. (2018) Fig tree, Tree figure drawing tool, Version 1.1.4 <https://github.com/rambaut/figtree/releases>
- Rowntree, J. K., Cowan, R. S., Leggett, M., Ramsay, M. M., Fay, M. F. (2010) Which moss is which? Identification of the threatened moss *Orthodontium gracile* using molecular and morphological techniques. Conservation Genetics 11:1033–1042. DOI: 10.1007/s10592-009-9948-3
- Stech, M., Frahm, J.-P. (1999) The status of *Platyhypnidium mutatum* Ochyra & Vanderpoorten and the systematic value of the Donrichardsiaceae based on molecular data. Journal of Bryology 21: 191–195. DOI: <https://doi.org/10.1179/jbr.1999.21.3.191>
- Ulvinen, T., Syrjänen, K., Anttila, S. (2002) Suomen sammalet- levinneisyys, ekologia ja uhanalaisuus. Suomen ympäristökeskus, Vammalan Kirjapaino Oy, Vammala 2002.
- Wynns, J. T., Lange, C. B. A. (2014) A comparison of 16 DNA regions for use as phylogenetic markers in the pleurocarpous moss genus *Plagiothecium* (Hypnales). American Journal of Botany 101: 652–669. DOI: 10.3732/ajb.1300269
- Wynns, J. T., Schröck, C. (2018) Range extensions for the rare moss *Plagiothecium handelii*, and its transfer to the resurrected genus *Ortholimnobia*. Lindbergia 41. DOI: 10.25227/linbg.01087

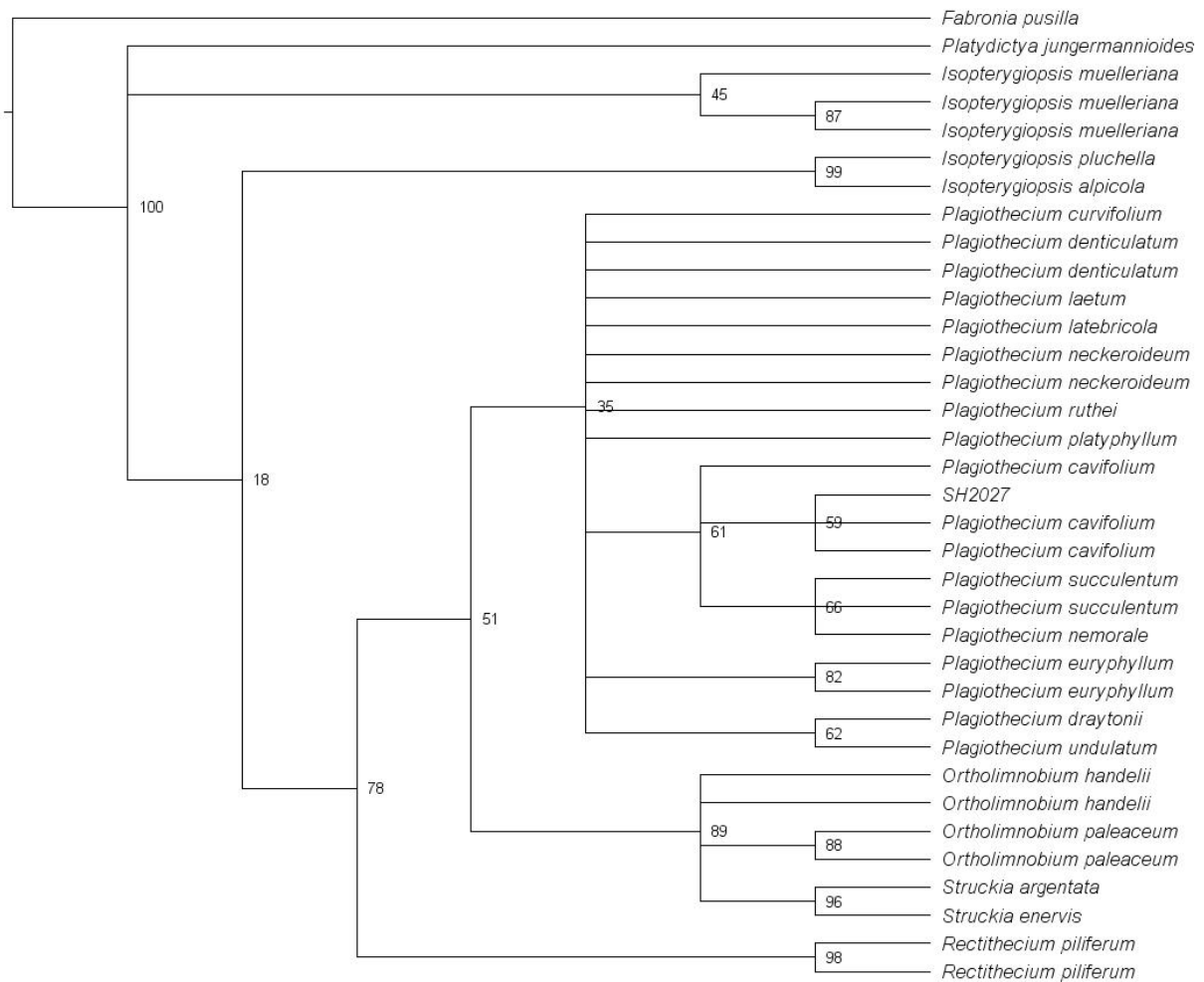
## Liitteet

Liite 1. Morfologisessa vertailussa käytettyjen sammalnäytteiden tunnuksset, niiden lehtien pituudet ja leveydet, ja pituuksien ja leveyksien keskiarvot ja keskihajonnat.

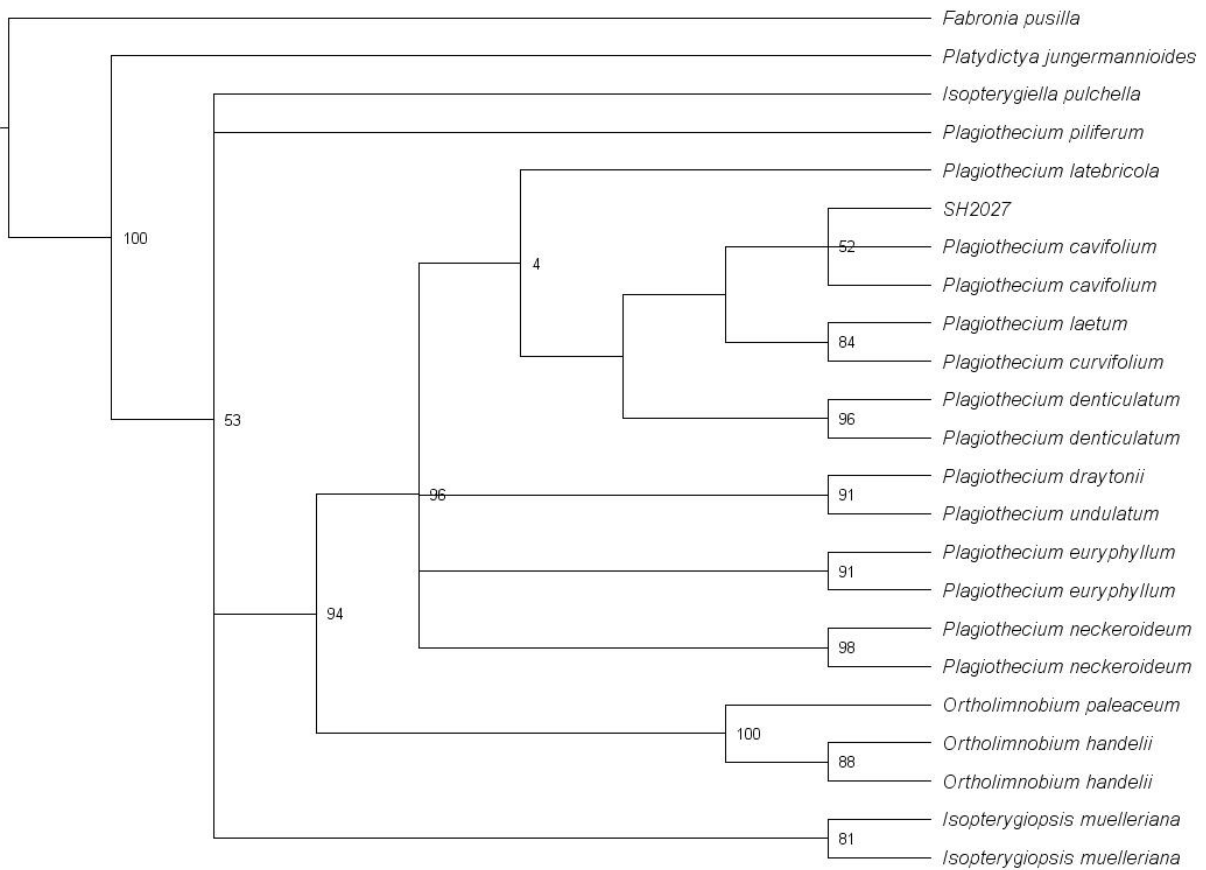
Pcavifolium_TUR123200		
Lehti	Pituus $\mu\text{m}$	Leveys $\mu\text{m}$
LH1	73,1	11,4
LH1	73,9	9
LH2	73,3	12
LH2	85,7	9,8
LH3	71,8	10,5
LH3	78,9	11,4
LH4	53	9,3
LH4	61,3	9,5
LH5	67,5	11,1
LH5	60,8	10,3
Keski-arvo	69,9	10,4
Hajonta	9,1	1

Pcavifolium_TUR127714		
Lehti	Pituus $\mu\text{m}$	Leveys $\mu\text{m}$
LH1	84,3	12,6
LH1	90,3	11
LH2	109	11
LH2	97,4	11,7
LH3	131,5	9,7
LH3	108,5	8,9
LH4	77,2	8,4
LH4	114,8	14,4
LH5	81,4	9,2
LH5	104,8	10,7
Keski-arvo	99,9	10,8
Hajonta	16,1	1,7

Ohandelli_H3112711		
Lehti	Pituus $\mu\text{m}$	Leveys $\mu\text{m}$
LH1	80,7	10,1
LH1	90,4	7,1
LH2	81,3	8,6
LH2	81,7	9
LH3	73,9	9,8
LH3	78	9,1
LH4	77	11,1
LH4	73,5	11,2
LH5	72,9	10,1
LH5	81,1	9,5
Keski-arvo	79,1	9,6
Hajonta	5	1,1



Liite 2. Tutkittavan näytteen (SH2027) ja 34:n geenipankista haetun ITS-sekvenssin pohjalta tehty fylogeniapuu. Tutkittava näyte muodostaa monofyleettisen ryhmän kourulaakasammalen (*Plagiothecium cavifolium* (Brid.) Z. Iwats) kanssa. *Ortholimnobium handelii* (Broth.) J.T. Wynns & C. Schröck -näytteet asettuvat puussa samaan ryhmään toistensa kanssa.



Liite 3. Tutkittavan näytteen (SH2027) ja 22:n geenipankista haetun rpl16-sekvenssin perusteella tehty fylogeniapuu. Tutkittava näyte muodostaa monofyleettisen ryhmän kourulaakasammalen (*Plagiothecium cavifolium* (Brid.) Z. Iwats) kanssa. *Ortholimnobium handelii* (Broth.) J.T. Wynns & C. Schröck -näytteet asettuvat puussa samaan ryhmään toistensa kanssa.