



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

***Trichomanes pinnatum* -saniaislajikompleksin taksonomiaa selvittämässä**

Jami Sundström

Ekologia ja evoluutiobiologia

Pro gradu -tutkielma

Laajuus: 30 op

3.2025

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Pääaine: Biologia

Tekijä: Jami Sundström

Otsikko: *Trichomanes pinnatum* -saniaislajikompleksin taksonomiaa selvittämässä

Ohjaajat: Hanna Tuomisto ja Samuli Lehtonen

Sivumäärä: 51 sivua + liitteet 3 sivua

Päivämäärä: 25.3.2025

Amazoniassa ja Panamassa tehdyissä lajistokartoituksissa on huomattu Hymenophyllaceae heimoon kuuluvan *Trichomanes pinnatum* Hedw. -lajin alla olevan kasveja, jotka ulkomuotonsa ja ekologiansa perusteella vaikuttavat omilta lajeiltaan ja, joita on kasvien erojen takia kutsuttu väliaikaisin nimin *Trichomanes sp. 1*, *Trichomanes sp. 4* ja *Trichomanes pinnatum*. Pro gradu -tutkielmassani tarkastelen, löytyykö näiden alustavien ryhmien mahdolliselle lajistatukselle näyttöä kasvien genetiikasta. Tähän käytän kartoituksissa kerätyistä kasvinäytteistä eristettyä DNA:ta sekä tutkimuslinjojen maaperänäytteistä analysoitua kationisumma-aineistoa. Maaperän kationisumman on todettu aiemmissa tutkimuksissa olevan tärkeä selittäjä neotropiikin terrestristen saniaislajien levinneisyyksille. Valitsin kolme kloroplasti-DNA:n geenien välistä aluetta. Analyyseihin otin mukaan *T. hostmannianum* (Klotzsch) Kunze, *T. cellulorum* Klotzsch ja *T. vittaria* DC -lajit, jotka ovat läheistä sukua *T. pinnatum* -kompleksille. Kloroplasti-DNA-alueiden linjattujen sekvenssien ja linjausten aukkojen perusteella tein Bayesilaisen analyysin, jonka tuloksena sain näytteiden todennäköisimpiä sukulaisuussuhteita kuvaavan konsensuspuun. Analyysin tuottamassa konsensuspuussa näytteet eivät ryhmittyneet, kuten ne oli morfologian perusteella määritetty. Tämän vuoksi en voinut tehdä tilastollista analyysia kaiken olemassa olevan aineiston pohjalta, vaan pystyin käyttämään ekologista aineistoa vain näytteiltä, joista DNA oli eristetty. Bayesilaisen analyysin konsensuspuun rinnalle tein kuvaajan, jossa näkyy kunkin näytteen keruulinjan logaritimuunnettu kationisumma sekä näiden oksakohtainen keskiarvo. Konsensuspuun perusteella kasvimuseoon kerättyjä prässäytyjä näytteitä käytiin läpi ja joitain näytteitä uudelleen määritettiin. Puun tyvelle asetui yksi selkeä ryhmä, joka vaikuttaa lupaavalta ja on mahdollisesti oma lajinsa. Tähän ryhmään kuuluvat yksilöt ovat myös ulkomuodoltaan keskenään samankaltaisia. Ryhmän näytteet nimettiin uudelleen *Trichomanes sp. 15* -taksoniksi. Muita lupaavia ryhmiä ovat *T. sp. 1*, Panamasta kerättyjen *T. pinnatum* -näytteiden ryhmä sekä yksittäinen Panamasta kerätty näyte, joka päättyi puussa omaan oksaansa. Näytteet vaatisivat vielä lisätutkimusta, etenkin tuma-DNA:n tutkiminen voisi tuoda selvyttä mahdollisiin lajirajoihin ja näiden hybrideihin.

Avainsanat: *Trichomanes pinnatum*, Hymenophyllaceae, polypodiopsida, lajikompleksi, saniainen, Amazonia, Panama

Master's thesis

Subject: Biology

Author: Jami Sundström

Title: Uncovering the taxonomy of *Trichomanes pinnatum* species complex

Supervisors: Hanna Tuomisto and Samuli Lehtonen

Number of pages: 51 pages + Appendices 3 pages

Date: 25.3.2025

While doing species inventories on transects in Amazonia and Panama it has been noticed that there are plants under the species *Trichomanes pinnatum* Hedw. in Hymenophyllaceae family that by their appearance and ecology might be their own species. Hence information and samples of these plants have been collected with temporary names of *Trichomanes sp. 1*, *Trichomanes sp. 4* and *Trichomanes pinnatum*. In this study I explore whether there is genetic evidence for the presence of several species under this species complex. For this I used the DNA extracted from the plant samples and the cation sum data that has been analyzed from the soil samples collected from the transects. In earlier studies, cation sum has been found to be an important variable explaining the occurrence of a terrestrial fern species in the Neotropics. From the extracted DNA I chose three inter-genic regions from the chloroplast DNA. As outgroups I took the close relatives for the species complex *T. hostmannianum* (Klotzsch) Kunze, *T. cellulosum* Klotzsch and *T. vittaria* DC. I ran a Bayesian analysis based on the aligned sequences of the three cpDNA-regions and the gaps in their alignment. From the analysis I got a consensus tree that depicts the most likely phylogenetic relationships between the plant samples. As the branches of the tree did not follow the expected groups given to the samples based on their morphology, I could not use all the existing data to run statistical analyses to see if there are statistical differences between the ecological niches of the possible species. I could only use the information of the plants that had had their DNA sequenced. I built a chart next to the Bayesian consensus tree visualizing the logarithm transformed cation sum of the transect where the sample has been collected and the mean between these values inside the branch. Based on the consensus tree we also investigated if there are systematic morphological differences between plants in different branches. Some names of the plants were updated. The most promising result from the study was the plant group which was renamed as *Trichomanes sp. 15*. Based on the basal position of the branch and the consistent morphology of the plant samples it seems likely that it forms a true new species. Other promising groups are *T. sp. 1* group, the *T. pinnatum* plants collected from Panama and a singular plant sample which is also collected from Panama. A further study of these plants is needed. A study of the nuclear DNA could be especially beneficial to clarify potential species and their hybrids.

Key words: *Trichomanes pinnatum*, Hymenophyllaceae, polypodiopsida, species complex, fern, Amazonia, Panama

Sisällys

| | |
|---|----|
| 1. Johdanto..... | 1 |
| 1.1 Saniaisten monimuotoisuus | 1 |
| 1.2 Saniaisten ekologia | 2 |
| 1.3 Neotropiikin saniaisten levinneisyyteen vaikuttavat tekijät | 4 |
| 1.4 Heimo Hymenophyllaceae | 6 |
| 1.5 Suku <i>Trichomanes</i> | 7 |
| 1.6 Lajikonsepti..... | 9 |
| 1.7 Lajikonseptin ongelma saniaisten kannalta | 10 |
| 1.8 Tutkimukseni tavoitteet | 12 |
| 2. Aineisto ja menetelmät | 13 |
| 2.1 Tutkimusalue | 13 |
| 2.2 Aineiston keruu | 14 |
| 2.3 DNA-menetelmät..... | 16 |
| 2.3.1 DNA:n eristys | 16 |
| 2.3.2 DNA-alueiden valinta | 17 |
| 2.3.3 Alukkeiden suunnittelu | 18 |
| 2.3.4 DNA-alueiden monistus | 19 |
| 2.3.5 Lopullisten DNA-alueiden valinta | 21 |
| 2.4 Aineiston käsittely | 23 |
| 2.4.1 Sekvenssiaineiston käsittely ja tarkastelu | 23 |
| 2.4.2 Sekvenssien valmistelu analyysia varten | 24 |
| 2.5 Bayesilainen analyysi | 26 |
| 2.6 Karttojen teko..... | 27 |
| 3. Tulokset | 27 |
| 3.1 Parsimonia-analyysin konsensuspuut | 27 |
| 3.2 Bayesilaisen analyysin konsensuspuut | 30 |
| 3.3 Prässäytyjen näytteiden tarkastelu | 32 |
| 3.4 Näytteiden maantieteellinen jakautuminen | 36 |
| 3.5 Kladien kationisummat..... | 38 |
| 4. Tulosten tarkastelu | 39 |
| Kiitokset..... | |
| Lähteet | |
| Liitteet | |

1. Johdanto

1.1 Saniaisten monimuotoisuus

Sanikkaiset on parafyleettinen ryhmä, johon luetaan lieot ja saniaiset. Näitä on noin 14 000 lajia, näistä liekomaisiin, Lycopodiopsida, kuuluu noin 1 500 lajia ja saniaisiin, Polypodiopsida, yli 12 400 lajia (Bánki *ym.*, 2025). Tieteelle uusia lajeja löydetään kuitenkin jatkuvasti, etenkin tropiikin syrjäisiltä alueilta. Kuvaava esimerkki tästä kerrotaan vuonna 2010 julkaistussa kirjassa (Kessler, 2010), jonka mukaan Bolivian tunnetusta saniais- ja liekolajistosta 9 % on löydetty maasta vasta kirjan julkaisua edeltäneen 10 vuoden aikana. Näistä maalle uusista lajeista kahden kolmanneksen kerrotaan löytyneen tuoreista näytteistä ja kolmanneksen vanhoista kasvikoelma-näytteistä (Kessler, 2010).

Saniaisilta puuttuu kukkakasveille tyypillinen interaktio pölyttäjien kanssa, joka on merkittävä luonnonvalintaväylä (Tryon, 1972). Kukkakasvien koevoluutio pölyttäjien kanssa onkin johtanut näiden nopeaan erikoistumiseen, mikä näkyy valtavana lajirunsautena verrattuna muihin kasveihin, kuten paljassiemenisiin, sammaliin, saniaisiin ja liekokasveihin. Koppisiemenisten räjähdysmäisellä runsastumisella ja erikoistumisella liitukaudella on kuitenkin ollut suuri vaikutus myös saniaisten monimuotoisuuteen ja valtaosa, noin 80 %, nykyisestä saniaislajistosta, on kehittynyt tällä aikakaudella (Schneider *ym.*, 2004).

Lehtipuiden muodostama tiivis latvusto on edellyttänyt kenttäkerroksen lajien sopeutumista aiempaa varjoisampaan ympäristöön (Schneider *ym.*, 2004; Sharpe *ym.*, 2010). Monilla saniaislinjoilla on sopeutunut proteiini, joka mahdollistaa tehokkaamman yhteyttämisen heikossa valossa. Tämä proteiini kuitenkin puuttuu varhaisemmilta saniaislinjoilta (Schneider *ym.*, 2004). Heikossa valossa pärjääminen on tuonut saniaisille etulyöntiaseman siemenkasveihin nähden tropiikin hämärässä kenttäkerroksessa. Lisäksi saniaisilla on usein kapea ekologinen lokero maaperän muuttujien suhteen. Yhdessä nämä tekijät voivat selittää trooppisten metsien saniaisten suurta lajirunsautta (Kreft *ym.*, 2010). Lehtipuiden kehittymisen myötä syntyi myös uusi ekolokero epifyyttikasveille. Saniaiset ovat orkideoiden ja ananaskasvien ohella runsaslajisimpia putkilokasviepifyyttejä (Lehnert & Krug, 2019).

Saniaisten monimuotoisuus on suurinta topografisesti vaihtelevilla, runsassateisilla trooppisilla vuoristoalueilla, etenkin pilvimetsissä (Barrington, 1993; Kessler, 2010). Vaikuttaa siltä, että vuoren pienet geologisesti eristyneet laikut toimivat lajiutumislle tärkeinä kohteina ja ekologinen erikoistuminen seuraa lajiutumista, eikä sinällään toimi lajiutumisen isolaatiomekanismina (Barrington, 1993). Saniaislajien globaalit monimuotoisuustrendit muistuttavat pääosin siemenkasvien vastaavia (Kessler, 2010; Kreft *ym.*, 2010). Tosin saniaisten monimuotoisuuden lisääntyminen liikuttaessa navoilta kohti päiväntasaajaa on kahdesta kolmeen kertaa jyrkempää (Kessler, 2010). Siemenkasveilla on myös suurta monimuotoisuutta välimerellisessä ilmastossa, kun taas saniaislajisto on tällaisilla alueilla köyhää (Kreft *ym.*, 2010). Maailmanlaajuinen keskiarvo osuudelle, jonka saniaiset muodostavat tietyn alueen putkilokasvilajistosta, on noin 3,6 %. Trooppisissa metsissä ja vuoristoilla vastaava osuus voi olla 13 %. Eristyneillä valtamerten saarilla saniaiset voivat kuitenkin vastata jopa 70 % putkilokasvien monimuotoisuudesta (Kessler, 2010).

1.2 Saniaisten ekologia

Saniaisilla ja liekokasveilla sukupolvien välillä vuorottelevat sporofyytti- ja gametofyyttikasvit (Sharpe *ym.*, 2010). Muista putkilokasveista poiketen, nämä vaiheet kykenevät elämään itsenäisesti toisistaan riippumatta (Nitta *ym.*, 2017). Diploidiset sporofyyttikasvit ovat niitä, joita tyypillisesti ajatellaan saniaisista puhuttaessa. Ne tuottavat aseksuaalisia haploidisia itiöitä, joista näiden itäessä kasvaa seksuaalisia sukusoluja tuottavia haploidisia gametofyyttejä. Gametofyytit ovat tyypillisesti pieniä, litteitä ja vihreitä kasveja, joiden tuottamat sukusolut kehittyvät hedelmöityessään taas sporofyytiksi. Sekä sporofyytit että gametofyytit voivat välillä lisääntyä myös suvuttomasti (Sharpe *ym.*, 2010).

Kasveilla on rakenteita, jotka vastaavat hiilensidonnasta, ja rakenteita, jotka kuluttavat hiiltä, mutta ovat vastuussa lisääntymisestä (Watkins *ym.*, 2016). Koppisiemenkasveilla nämä rakenteet ovat tyypillisesti lehdet ja kukka. Saniaisilla lisääntymisestä vastaavat itiöpesäkkeet sijaitsevat sporofyyttikasvien lehdissä. Saniaisilla on erikseen steriilejä ja fertiilejä lehtiä. Nämä voivat olla joko samannäköisiä siten, että molemmissa on saman verran lehtisolukkoa, mutta vain fertiileissä lehdissä on itiöpesäkkeet, tai erilaistuneet, jolloin fertiilit ja steriilit lehdet voivat olla morfologialtaan hyvin erilaisia. Näistä

jälkimmäisen kaltaisia kasveja kutsutaan dimorfisiksi. Joillakin lajeilla vain osa fertiilistä lehdestä, esimerkiksi lehden kärki, poikkeaa morfologialtaan steriilistä lehdestä. Tällöin voidaan puhua hemidimorfiasta (Watkins *ym.*, 2016).

Wagner ja Wagner (1977) arvioivat dimorfisten saniaisten muodostavan noin 20 % kaikista saniaisista. Kasvin dimorfisuus onkin tärkeä tuntomerkki ja tämän perusteella on myös tehty taksonomista jaottelua. Lehtien dimorfiaa esiintyy kuitenkin kaikissa saniaisheimoissa ja erilaisissa ympäristöissä. Dimorfiassa fertiili lehti on usein kohonneena muiden yli ja/tai steriilit lehdet ovat matalalla lähellä maata. Dimorfian on ajateltu olevan adaptaatio, jolla itiöiden leviäminen tehostuu. Fertiilien lehtien usein pystyn asennon on ajateltu altistavan lehdet kuivumiselle, jolloin itiöpesäkkeet aukeavat. Fertiilien lehtien pystyn asennon myötä itiöpesäkkeet ovat myös sijoittuneet steriilien lehtien yläpuolelle, jolloin vapautuvat itiöt pääsevät esteettömämmin leviämään tuulen mukana (Wagner & Wagner, 1977).

Tuulen mukana saniaisten kevyet itiöt leviävät helposti pitkiäkin matkoja (Barrington, 1993; Lima *ym.*, 2020). Tryon (1972) osoittaa artikkelissaan eristyneiden saarten saniaisten itiöiden leviämisen olevan mahdollista jopa 3 200 km päähän. Suhteellisen tiheästi itiöiden leviämistä tapahtuisi 800 km päähän (Tryon, 1972). Varsinkin metsäympäristössä, valtaosa itiöistä laskeutuu kuitenkin emokasvin välittömään läheisyyteen. Avoimella paikalla kasvavalla kasvilla on suurempi todennäköisyys saada itiönsä leviämään kauemmas (Raynor *ym.*, 1976).

Vaikka levittäytyminen tapahtuu pääasiassa tuulen avulla, saniaisilla tavataan myös eläinvektoreita. Muun muassa lepakoiden ja lintujen on havaittu levittävän jätöksiensä mukana itämiskykyisiä saniaisten itiöitä (Hervías-Parejo *ym.*, 2019; Brock & Collier, 2020). Näiden merkitys saniaisten leviämiselle lienee kuitenkin vähäinen. Koevoluution myötä kehittyneet specialistiherbivorit ovat myös saniaisilla harvinaisia. Lajien levinneisyys onkin kytkeytynyt koppisiemenisiä kasveja tiukemmin abioottisiin tekijöihin, kuten ilmastoon ja maaperän ominaisuuksiin, kuin monimutkaisiin biologisiin vaikutussuhteisiin (Barrington, 1993).

1.3 Neotropiikin saniaisten levinneisyyteen vaikuttavat tekijät

Maaperän ominaisuuksien on todettu olevan tärkeitä muuttujia selitettäessä saniaislajiston alueellista vaihtelua sekä Amazoniassa että Panamassa (Tuomisto *ym.*, 1998, 2003, 2014, 2019; Zuquim *ym.*, 2012; Jones *ym.*, 2013; Lehtonen *ym.*, 2015). Maaperän ominaisuudet riippuvat maa-aineksen alkuperästä, mineraalikoostumuksesta ja siitä kuinka kauan se on ollut alttiina eroosiolle (Tuomisto *ym.*, 2019). Ominaisuudet ovat moniin muihin ympäristötekijöihin verrattuna suhteellisen stabiileja (Tuomisto *ym.*, 2003). Erityisesti maaperän kationisumman, eli Ca, Mg ja K pitoisuuksien summan logaritimuunnos on osoittautunut merkittäväksi selittäväksi muuttujaksi useassa tutkimuksessa. Logaritimuunnos on ekologisesti perusteltu, sillä pitoisuuksien erot ovat kasvillisuudelle verrattain merkittävämpiä ravinteisuusgradientin köyhemmässä päässä (Tuomisto *ym.*, 2003; Zuquim *ym.*, 2014).

Amazoniassa saniais- ja liekolajiston alueellisen vaihtelun on huomattu vastaavan Melastomataceae-heimon kasvien lajiston alueellista vaihtelua (Tuomisto *ym.*, 2003). Näiden kenttäkerroksen kasvilajistojen alueelliset muutokset olivat yhteydessä taas maaperän muuttujiin. Lisäksi lajistojen alueellinen vaihtelu korreloi Landsat-satelliittien tuottaman rasteriaineiston pikselien heijastearvojen kanssa, mikä viittaa siihen, että kenttäkerroksen saniais- ja liekolajiston alueellinen vaihtelu on yhtenevää puulajiston alueellisen vaihtelun kanssa (Tuomisto *ym.*, 2003, 2019).

Panamassa alueellinen vaihtelu vuotuisessa sademäärässä voi olla suurtakin maantieteellisesti läheisten alueiden välillä (Jones *ym.*, 2013). Tästä huolimatta maaperänmuuttujilla vaikuttaisi olevan ilmastoa merkittävämpi yhteys saniaislajiston alueelliseen vaihteluun myös Panamassa. Jonesin *ym.* (2013) artikkelissa, jossa verrattiin Panaman puiden sekä saniaisten ja liekojen lajistokoostumusta suhteessa ilmastoon ja maaperään, puulajiston huomattiin olevan saniaisia ja liekoja vahvemmin yhteydessä ilmastoon. Puulajiston ottaminen mukaan selittäjäksi saniais- ja liekolajistomuutoksille kuitenkin paransi mallin selittävyttä. Tämän arveltiin artikkelissa liittyvän eri puulajien erilaisiin mikroilmastovaikutuksiin (Jones *ym.*, 2013). Saniaiset ovat puita parempia levittäytymään, tämän on ajateltu mahdollistavan saniaisten erikoistumisen maaperämuuttujien suhteen kapealle ekologiselle lokerolle (Zuquim *ym.*, 2012; Tuomisto *ym.*, 2024).

Eri lajien esiintyminen ravinteisuusgradientilla ei ole myöskään fylogeneettisesti satunnaista. Lehtonen ym. (2015) tutkivat maaperän ravinnepitoisuuden ja sademäärien yhteyttä Amazonian ja Panaman terrestristen saniaislaajiyhteisöiden fylogeneettiseen rakenteeseen. Myös heidän tutkimuksessaan maaperän kationipitoisuus osoittautui sademäärää tärkeämmäksi selittäjäksi saniaislajiston alueellisille eroille. Lehtonen ym. huomasivat Brasilian Amazonian saniaissukujen olevan evolutiivisesti Panaman sukuja vanhempia. Muun muassa *Trichomanes* ja *Lindsaea* ovat vanhoja sukuja, jotka ovat vahvasti edustettuja köyhemmillä maaperillä Amazonissa. Maaperän kationipitoisuuden noustessa taas lajit ovat läheisempää sukua keskenään, kuin voisi sattumalta odottaa. Keskimääräinen fylogeneettinen monimuotoisuus on siis pienempää ravinteisemmillä alueilla. Ravinteisuudeltaan erittäin köyhillä alueilla oli vain näihin erikoistuneiden sukujen kasveja, kun taas ravinteikkailla alueilla oli sekä ravinteiseen maahan erikoistuneita että generalistisukujen kasveja. Neotropiikin saniaisten voikin olla helpompaa sopeutua elämään aiempaa ravinteisemmillä mailla kuin toisinpäin (Tuomisto ym., 2014; Lehtonen ym., 2015). Panamassa myös sademäärän kasvaessa lajiston fylogeneettinen läheisyys laski. Samanlaista trendiä ei tutkimuksessa havaita Amazonian osalta, mutta tämän Lehtonen ym. arvelivat liittyvän sademäärän suurempaan alueelliseen vaihteluun Panaman sisällä (Lehtonen ym., 2015).

Saniaiset ja liekokasvit ovat osoittautuneet hyvin toimiviksi indikaattoreiksi maaperämuuttujien sekä puulajiston alueellisen vaihtelun suhteen (Tuomisto & Ruokolainen, 1994; Ruokolainen ym., 1997; Zuquim ym., 2014). Saniaislajistoa on suhteellisen vähän ja nämä ovat monia muita neotropiikin lajiryhmiä helpompia tunnistaa maastossa (Zuquim ym., 2014; Tuomisto ym., 2019). Tällaisissa tutkimuksissa oikea lajintunnistus onkin tärkeää.

Vaikka saniaiset ovatkin hyviä leviämään pitkiä matkoja tuulen mukana jopa mantereiden välillä, muodostavat Andit ainakin osittaisen esteen niiden levittäytymiselle. Arviolta 25 % Kolumbian ja Ecuadorin Andien länsipuolella olevasta saniaislajistosta puuttuu Andien itäpuolelta. Osa lajistoeroista voi selittyä toki myös ympäristömuuttujien eroissa rinteiden välillä (Kessler, 2010).

1.4 Heimo Hymenophyllaceae

Sammalsaniaiskasvien heimo Hymenophyllaceae kuuluu saniaisten alaluokkaan Polypodiidae ja siihen kuuluu yli 400 lajia (PPG I, 2016). Heimon uskotaan olleen olemassa jo ennen koppisiemenisten kasvien syntymistä (Lehnert & Krug, 2019). Heimon saniaiset ovat hygrofiileja, eli esiintyvät lähinnä alueilla, joilla on paljon kosteutta kuten sumumetsissä ja vesiputousten lähellä. Heimon kasveja esiintyy ympäri tropiikkia, mutta muutamia tavataan myös lauhkealla vyöhykkeellä (Ebihara *ym.*, 2007; Dubuisson *ym.*, 2011). Heimo on hyvin monimuotoinen sisältäen niin terrestrisiä, kiipeileviä, hemiepifyyttisiä ja epifyyttisiä lajeja (Hennequin *ym.*, 2008). Terrestrisyys vaikuttaa olevan heimolla alkuperäinen peritty piirre ja kasvit olisivat siirtyneet muihin kasvumuotoihin vasta myöhemmin heimon evolutiivisessa historiassa (Hennequin *ym.*, 2008). Yhteistä heimon edustajille on hyvin ohut, usein vain yhden solun paksuinen lehtilapa sekä lehden reunalla sijaitseva itiöpesäke (Pryer *ym.*, 2001). Tyypillistä heimon lajeille on myös kuivumiselta suojaavan kutikulan, erikoistuneen epidermisolukon ja ilmarakojen puuttuminen, joten kasvit vaativatkin läpi kasvukauden kosteana pysyvän elinympäristön (Schneider, 2000; Dubuisson *ym.*, 2011; Nitta *ym.*, 2021). Kasvit ovat muista saniaisista poiketen myös sporofyyttivaiheessaan poikilohydrisiä. Ne muistuttavatkin usein ekologiaaltaan ja ulkonäöltään sammalia (Nitta *ym.*, 2021).

Hymenophyllaceae-heimon kasveilla on vihreät itiöt eli näiden itiöissä on aktiivisia kloroplasteja (Tryon, 1970; Mellado-Mansilla *ym.*, 2022). Tällaisia on saniaislajeista vain noin 14 %. Vihreät itiöt ovat yleensä lyhytikäisempiä, eläen keskimäärin 48 vuorokautta, kuin viherhiukkasettomat itiöt, jotka voivat lepotilassa pysyä itämiskykyisinä vuosia maaperän itiöpankissa (Mellado-Mansilla *ym.*, 2022). Itiöiden verrattaisesta lyhytikäisyydestä huolimatta heimo on levinnyt tehokkaasti pitkiä matkoja valtamerten kaukaisille saarille. Se onkin yliedustettuina monien saarten lajistoissa (Tryon, 1970). Lepotilan puuttumisen on ajateltu mahdollistavan itiön nopean itämisen ja tekevän vihreäitiöisistä lajeista parempia uusien ympäristöjen valloittajia. Lepotilassa olevilla lehtivihreättömillä itiöillä voi kestää jopa kuukausia itämisessä. Vihreät itiöt ovat yleisempiä epifyyttisaniaisilla — noin 82 % vihreäitiöisistä lajeista on epifyyttejä. Terrestrisistä viheritiöisistä noin 87 % kuuluu Hymenophyllaceae- tai Polypodiaceae-heimoihin (Mellado-Mansilla *ym.*, 2022).

Aiemmin Hymenophyllaceae-heimo on jaettu kahteen sukuun, *Hymenophyllum*- ja *Trichomanes*-sukuihin (Pryer *ym.*, 2001; Ebihara *ym.*, 2007). Ebihara *ym.* (2006) päätyivät kuitenkin *rbcL*-geeniin pohjautuvan taksonomisen tarkastelun perusteella esittämään heimon järjestelyä uudelleen, jakaen sen kahteen alaheimoon ja nämä edelleen yhdeksään sukuun. Heimon ja alaheimojen monofyleettisyydelle on vahva tuki. Alaheimojen sisäiset sukujaottelut ovat kuitenkin olleet vähemmän tuettuja ja vaihdelleet paljon eri tutkijoiden välillä. Myöhemmin vuonna 2016 tämä uudelleenjako sai tukea 94 kirjoittajan julkaisussa, jossa sanikkaisten taksonomiaan perehtynyt tutkijajoukko, Pteridophyte Phylogeny Group (PPG), esitti konsensushypoteesinsa sukutasolle menevästä sanikkaisten fylogeniasta (PPG I, 2016). PPG I tukee Ebiharan *ym.* (2006) esittämää jaottelua, jossa Hymenophyllaceae jakautuisi kahteen alaheimoon — yksi sukuiseen Hymenophylloideae- sekä kahdeksan sukua sisältävään Trichomanoideae-alaheimoon (Ebihara *ym.*, 2006; PPG I, 2016).

Alaheimot erkanivat toisistaan trias- ja jurakauden vaihteessa tai jurakauden puolella välissä (Hennequin *ym.*, 2008). Näistä Trichomanoideae-linja vaikuttaisi olevan erilaistunut aikaisemmin, mikä osaltaan selittää sen sisällä olevaa suurempaa morfologista ja ekologista vaihtelua (Ebihara *ym.*, 2006). Suuri osa heimon nykyisestä monimuotoisuudesta kehittyi kuitenkin verrattain myöhään. Etenkin heimon epifyyttiset suvut kuten *Hymenophyllum*, *Polyphlebium*, *Didymoglossum* ja *Crepidomanes* ovat erilaistuneet myöhäisellä liitukaudella ja paleogeenikaudella, kun avoimemman latvuston puusaniaisista ja paljassiemenisistä kasveista koostuvat metsät korvautuivat pääasiallisesti koppisiemenisistä koostuvilla, varjoisemmilla metsillä (Hennequin *ym.*, 2008).

1.5 Suku *Trichomanes*

Trichomanes eli harjassaniaiset on yksi Trichomanoideae-alaheimon kahdeksasta esitetystä suvusta. Ekologisen monimuotoisuutensa myötä *Trichomanes* on sukuna myös morfologisesti vaihteleva. Tämän takia onkin ollut hyvin vaikea homologioiden kautta päätellä suvun sisäisiä sukulaisuussuhteita (Dubuisson *ym.*, 1998). Tyypillistä suvun lajeille on kuitenkin kertaalleen parilehdykkäiset tai parilehdykkäiset ja halkoiset lehdet. Toisaalta suvussa on myös useaan kertaan parilehdykkäisiä lajeja kuten *Trichomanes elegans* Rich. (Dubuisson *ym.*, 2022).

Suku sisältää arviolta yli 60 lajia. Ebihara ym. (2006) jakavat suvun edelleen vielä alasukuihin *Trichomanes*, *Feea*, *Davalliopsis* ja *Lacostea*. Näiden alasukujen monofyleettisyyttä tukee Dubuissonin ym. (2022) artikkelin tulokset. Suvun on aiemmin katsottu olevan tiukasti neotrooppinen. Dubuisson ym. esittävät kuitenkin suvussa tapahtuneen ainakin kaksi leviämistapahtumaa neotropiikin ulkopuolelle — Afrikassa on yksi ja Madagascarilla ja Intian valtameren saarilla neljä sukuun kuuluvaa lajia. Molekyyliaineiston perusteella näistä neljän lajin katsotaan muodostavan kladin tai alasukun, jota Dubuisson ym. kutsuvat *Afrotrichomanes*-nimellä (Dubuisson ym., 2022). *Trichomanes*-alasukuun kuuluu arviolta yli 30 lajia (Ebihara ym., 2006). Nämä ovat pääosin terrestrisiä (Dubuisson ym., 2011). Alasukussa on myös lehdiltään dimorfisia lajeja. Tämä on heimossa poikkeuksellista; ainoa toinen dimorfinen ryhmä on niin ikään *Trichomanes*-suvun alasuku *Feea* (Dubuisson ym., 2022).

Etelä-Amerikassa suoritetuissa linjalaskennoissa on huomattu, että *Trichomanes pinnatum* Hedw. -lajiksi nykyään ajateltujen kasvien joukossa saattaisi näiden morfologian ja kasvupaikkojen perusteella olla todellisuudessa useampia mahdollisia erillisiä lajeja. Näitä onkin alettu kerätä erillisinä potentiaalisina lajeina väliaikaisin tunnistein *Trichomanes sp. 1* ja *T. sp. 4*. (Hanna Tuomisto, suullinen tiedoksianto 4.8.2023) Näistä *T. sp. 1* esiintyy märemmillä kasvupaikoilla ja tällä on tukevampi ja vaakasuora juurakko. *T. sp. 4* -kasveja taas tavataan kuivemmilla alueilla ja näiden juurakko on sirompi ja pysty (Hanna Tuomisto, suullinen tiedoksianto 4.8.2023). Kaikki tämän *T. pinnatum* -kompleksin kasvit ovat terrestrisiä ja dimorfisia.

Saniaisten käyttökelpoisuutta maaperän ominaisuuksien indikaattoreina tutkivassa artikkelissa Zuquim ym. (2014) totesivat *T. pinnatum* -lajin indikoivan hyvin kationipitoisuudelta köyhää maaperää. Tutkimuksessa oli aineistoa 326 koealalta Keski- ja Pohjois-Amazoniasta. Kaikista harvinaisimmat lajit eli sellaiset, joita esiintyi viidellä tai sitä harvemmallalla koealalla, jätettiin tutkimuksessa huomiotta. Tämän jälkeen tutkimusaineistoon jäi 54 lajia. Näistä lajeista *T. pinnatum* osoittautui tutkimusalueella kaikista yleisimmäksi ja runsaimmaksi (Zuquim ym., 2014). Tutkimuksessa ei ollut eritelty odotettuja taksoniteita *T. sp. 1* ja *T. sp. 4*, vaan nämä olivat kaikki lajin *T. pinnatum* alla (Hanna Tuomisto, suullinen tiedoksianto 7.3.2025).

1.6 Lajikonsepti

Biologiassa lajin konsepti ei ole aivan niin yksinkertainen, kuin saattaisi aluksi kuvitella. Ernst Mayr aloitti, julkaistuaan vuonna 1942 kirjan *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*, keskustelun lajin riittävästä määritelmästä. Vieläkään ei olla päästy yksimielisyyteen siitä, kuinka laji tulisi määritellä.

Yatskievych ja Moran (1989) tarkastelevat artikkelissaan saniaistutkijoiden käyttämiä lajimääritelmiä. He nostavat esille kolme toistuvaa määritelmää: biologinen, morfologinen ja ”look-alike” lajimääritelmä. Biologinen lajikonsepti saattaa olla yleisesti kaikista suosituin, tosin saniaisten yhteydessä se on harvoin käytetty (Yatskievych & Moran, 1989; Bickford *ym.*, 2007). Tässä lajin muodostavat populaatiot, jotka lisääntyvät keskenään tai potentiaalisesti pystyisivät lisääntymään keskenään, ja ovat eristäytyneet toisista vastaavista populaatioista. Tässä lajeilla on siis lajirajat ylittävän lisääntymisen estäviä mekanismeja, kuten gameettien yhteensopimattomuutta (Yatskievych & Moran, 1989; Bickford *ym.*, 2007; Rieseberg & Willis, 2007). Usein ei kuitenkaan ole tietoa, pystyvätkö mahdolliset eri lajit lisääntymään keskenään. Tällä lajimääritelmällä myös moni ekologisesti ja/tai maantieteellisesti toisistaan erottuva taksoni voidaankin niputtaa yhden lajin alalajeiksi (Yatskievych & Moran, 1989).

Yatskievych ja Moran (1989) toteavat morfologisessa lajikonseptissa eri lajeiksi katsottavan kasvit, jotka eroavat ulkomuodon vaihtelultaan toisistaan selkeärajaisesti. Tämän kirjoittajat tiedostavat olevan varsin subjektiivinen kriteeri. Konsepti on kuitenkin se, mitä tyypillisesti kasvikokoelmien parissa työskentelevät saniaistutkijat ovat käyttäneet (Yatskievych & Moran, 1989). Look-alike-konseptin katsotaan artikkelissa menevän morfologisen konseptin alatyypiksi. Se on samankaltainen, mutta tässä kaksi toisiaan muistuttavaa ryhmää voidaan katsoa saman lajin eri varianteiksi, siinä missä morfologisessa konseptissa näiden katsottaisiin olevan omia lajejaan (Yatskievych & Moran, 1989).

Lajikonseptit voidaan jakaa myös historiallisiin ja sukuun sekä ominaisuuksiin perustuviin konsepteihin (Baum & Donoghue, 1995). Ominaisuuskonsepteissa yksilöt kuuluvat samaan lajiin, jos ne jakavat tietyn ominaisuuden tai sarjan ominaisuuksia keskenään. Historiaan ja sukuun perustuvat konseptit katsovat yksilön kuuluvan lajiin

vain, jos se on sukua muille lajiin kuuluville yksilöille. Tässäkin tosin tarvitaan ulkoisia tuntomerkkejä, jotta mahdollinen sukulaisuus voidaan tunnistaa (Baum & Donoghue, 1995).

1.7 Lajikonseptin ongelma saniaisten kannalta

Kasvien osalta lajin määrittelyminen ei ole kovin yksinkertaista. Eri lajeiksi intuitiivisesti katsotut yksiköt voivat toisinaan lisääntyä keskenään ja tuottaa lisääntymiskykyisiä jälkeläisiä. Näin ollen biologisen lajikonseptin soveltaminen voi olla välillä hankalaa. Kryptiset lajit taas ovat ristiriidassa pelkkään morfologiaan perustuvan lajikäsityksen kanssa.

Kuten kasveilla yleisesti, on lajien välinen risteytyminen yleistä saniaisilla. Saniaisilla tämä on vielä yleisempää kuin koppisiemenisillä. Risteymiä eli hybrideitä voi syntyä, kun seksuaalisesti lisääntyvien lajien väliset lisääntymisestemekanismit eivät ole eriytyneet merkittävästi toisistaan. Populaatioryhmien välisten lisääntymisestemekanismissa kehittyminen mahdollistaa geneettisten erojen kertymisen populaatioiden välillä ja siten populaatioiden sopeutumisen aiempaa paremmin omiin ympäristöihinsä. Risteytymiä estäviä mekanismeja on yleensä toiminnassa useita samaan aikaan (Rieseberg & Willis, 2007).

Alttius hybridien syntymiselle vaihtelee kasviheimojen välillä. Lauhkeiden alueiden saniaislinjoilla on havaittu olevan keskimäärin noin 0,17 hybridilajia ei-hybridia kohden. Koppisiemenisillä tämä luku on 0,06 (Whitney *ym.*, 2010). Tropiikin saniaisilla hybridien on ajateltu olevan vähemmän yleisiä, kuitenkin Keskinivan *ym.* painossa olevassa artikkelissa todetaan ainakin trooppiseen Marattiaceae-heimoon kuuluvan *Danaea*-suvun suhdeluvun nousevan luultavasti samoihin arvoihin lauhkean vyöhykkeen keskiarvon kanssa. Asiaan liittyi kirjoitushetkellä vielä epävarmuuksia (Keskiniva *ym.*, painossa).

Toisin kuin suuri osa koppisiemenisistä kasveista, saniaiset eivät tarvitse koirasgameettien kuljetukseen eläinvektoreja, vaan nämä kykenevät uimaan itse. Tämän myötä niillä on vähemmän isolaatiomekanismeja verrattuna kukkakasveihin. Tätä on esitetty yhdeksi syyksi saniaisten hitaalle lajiutumisen ja sille, miksi kukkakasvien määrä (noin 350 000 lajia) on saniaisiin (noin 12 400 lajia) verrattuna moninkertainen

(Rothfels *ym.*, 2015; Bánki *ym.*, 2025). Tämä on myös yksi mahdollinen syy, miksi lajien välinen risteytyminen on saniaisilla niin yleistä.

Hybridit ovat usein vanhempiensa välimuotoja morfologisesti ja ne esiintyvät usein vanhempiensa kanssa samoilla alueilla, mikä osaltaan vaikeuttaa näiden tunnistusta maastossa. On myös raportoitu, että mikäli vanhemmat suosivat keskenään erilaisia habitaatteja, muistuttaa näiden risteymä usein enemmän toista vanhempaansa riippuen siitä, kummassa habitaatissa tämä kasvaa (Barrington *ym.*, 1989). Saniaiset voivatkin risteytyä keskenään vaikka kantalajit eivät ole ekologisesti samanlaisia. Ekologinen erikoistuminen ei siis vielä riitä isolaatiomekanismiksi. Ekologialtaan erilaisten kantalajien muodostamat hybridit ovat yleisempiä alueilla, joilla on ollut voimakasta häiriötä, kuten ojien penkoilla (Barrington, 1993).

Tyypillisesti hybridin muodostavat kantalajit ovat läheistä sukua toisilleen (Tryon, 1948; Barrington, 1993). Näin ei aina kuitenkaan ole. Hybridisaatio voi olla mahdollista myös toisistaan evolutiivisesti hyvin etäisten lajien kesken. Ranskan Pyreneiltä on löydetty saniaisen \times *Cystocarpium roskamianum* Fraser-Jenk., jonka todettiin olevan risteymä *Gymnocarpium*- ja *Cystopteris*-sukuisten lajien kesken. Suvut jakoivat yhteisen esi-isän arviolta 60 miljoonaa vuotta sitten. Kyseinen risteymä on steriili, mutta lisääntyy kasvullisesti (Rothfels *ym.*, 2015).

Samojen lajien välinen risteytyminen voi tapahtua myös useampaan kertaan (Liu *ym.*, 2018). Hybridien syntyminen voi lisätä monimuotoisuutta johtamalla nopeaan sopeutumislevittäytymiseen (Seehausen, 2004). Toisaalta ne voivat myös vähentää monimuotoisuutta esimerkiksi hybridien syrjäyttäessä kantalajit (Todesco *ym.*, 2016). Hybridilajiutumista on kahta tyyppiä, homoploidiaa ja polyploidiaa (Rieseberg & Willis, 2007). Homoploidiaassa syntyvä jälkeläinen on kromosomimäärältään samankaltainen kuin vanhempansa. Polyploideilla kromosomisto on tuplaantunut. Näistä homoploidinen lajiutuminen on paljon harvinaisempaa. Syntyneet risteymät takaisinristeytyvät helposti kantalajien kanssa. Polyploideilla ploidiatason muutos suojaa lajia takaisinristeytymiseltä. Polyploidit ovat helppo tunnistaa risteymiksi kromosomistoa tarkastelemalla (Rieseberg & Willis, 2007).

Artikkelissaan Barrington ym. (1989) toteavat hybridien tuntomerkkeinä olevan saniaisilla usein itiöpesäkkeiden avautumattomuus, vaihtelu itiöiden koossa ja muodossa yhdistettynä keskivertoiseen olemukseen kantamuotojen suhteen. Myös isotsyymejä, eli entsyymejä, jotka katalysoivat keskenään samaa reaktiota, mutta eroavat rakenteellisesti toisistaan, on käytetty hybridien sukulaisuusien selvittelyssä (Barrington ym., 1989). Nykyään DNA:han perustuvat tutkimusmenetelmät ovat tulleet tutkijoiden avuksi. Hybridillä tuman DNA on peritty puoliksi kummaltakin risteytyneeltä kantalajilta. Näiden verkkomaisten sukulaissuhteiden selvittelyä varten on kehitetty DNA:n faasaus menetelmiä (Bloesch ym., 2022; Tseng ym., 2024; Keskiniva ym., painossa).

Toinen lajikäsitteen kannalta vaikea asia on kryptiset lajit. Kryptisillä lajeilla tarkoitetaan kahta tai useampaa lajia, jotka näyttävät samalta (Bickford ym., 2007). Nämä voivat olla keskenään evolutiivisesti läheisiä ja muodostaa monofyleettisen ryhmän, mutta toisinaan kryptiset lajit ovat evolutiivisesti kaukana toisistaan (Kinosian ym., 2020; Keskiniva ym., 2024). Lajiutumisen ei aina johda morfologisiin eroihin lajien välillä. Kryptisten lajien tutkimus on runsastunut valtavasti DNA:han pohjautuvien tutkimusmenetelmien halpenemisen myötä (Bickford ym., 2007). Kryptiset lajit poikkeavat usein ekologisilta lokeroiltaan. Erot voivat olla kuitenkin vähäisiä, jolloin näiden huomaamiseen saattaa tarvita monimuuttujamenetelmiä (Hirzel ym., 2002; Dennis & Hellberg, 2010).

Myös fenotyypinen plastisuus tuo omat haasteensa morfologiaan pohjautuvan lajikäsitteen kannalta. Fenotyypinen plastisuus on ympäristön aikaansaamaa vaihtelua eliön kasvussa tai kehityksessä (Bradshaw, 1965; Alpert & Simms, 2002). Vaikka kahdella kasvilla olisi keskenään identtinen perimä, voivat nämä ympäristön vaikutuksesta kasvaa näyttämään keskenään hyvinkin erilaisilta (Nakayama ym., 2017).

1.8 Tutkimukseni tavoitteet

Amazoniasta kerätyistä kasvikokoelmanäytteistä jopa 40 % on arvioitu väärin tunnistetuiksi (Hopkins, 2007). Lajien ja näiden levinneisyyksien tuntemus on kuitenkin tärkeää esimerkiksi lajien monimuotoisuuden suojelun suunnittelussa ja päättäjien neuvonnassa (Thomas, 1999). Pro gradu -tutkielmassani pyrin osaltani selvittämään neotropiikin monimuotoisuutta tarkastelemalla *Trichomanes pinnatum* -saniaislajikompleksia, jonka mahdolliset lajirajaukset ovat yhä epäselviä. Tutkielmassani pyrin selvittämään kyseisen kompleksin lajirajauksia käyttäen näytteistä eristettävää

DNA:ta sekä linjalaskentojen yhteydessä kerättyä maaperäaineistoa. Teen DNA:n perusteella fylogeniapuun, jonka jälkeen tarkastelen, eroavatko löydetyt sukulinjat toisistaan ekologiaaltaan, eli kasvupaikkansa maaperän ravinteisuudelta.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1 Tutkimusalue

Tutkielmassani käyttämiäni *Trichomanes pinnatum* -lajikompleksin näytteitä on kerätty sekä Etelä-Amerikan puolelta Amazoniasta, että Panamasta. Alueet eroavat maaperältään toisistaan geologisen historiansa vuoksi. Maaperämuuttujien on aiemmissa tutkimuksissa todettu olevan merkittäviä selittämään alueellisia eroja neotropiikin saniaislaajistossa.

Panama koostui aiemmin sarjasta vulkaanisia saaria. Saaret yhdistyivät Pohjois-Amerikkaan varhaismioseenina. Panaman niemimaa oli olemassa jo noin 19 M vuotta sitten. Kuitenkin Väli-Amerikan ja Etelä-Amerikan erottava Atrato-meriväylä umpeutui vasta noin 3 M vuotta sitten (Kirby *ym.*, 2008). Alue on mosaiikki tuliperäisestä ja merellisen geologisen muodostuman maaperästä (Jones *ym.*, 2013). Alue on geologiselta iältään verrattain nuori ja sen maaperän ravinnepitoisuus on suuri verrattuna Amazoniaan (Lehtonen *ym.*, 2015).

Amazonian alueella on pitkä ja monivaiheinen geologinen historia. Alueen itäosissa maan pintaan nouseva Amazonian kratoni muodostaa alueen vanhimman maaperän. Kratoni on muodostunut prekambrisella kaudella, vanhimmat osat ovat arkeisen eonin perua (Kroonenberg & de Roever, 2010). Kratonista eroosion myötä syntynyt maaperä on erittäin niukkaravinteista (ter Steege *ym.*, 2010).

Andien nousu oli alkanut jo aiemmin, mutta nopeutui Farallonin laatan hajotessa Nazca ja Kookossaaren laatoiksi noin 23,4 M vuotta sitten. Syyksi kiihtyneelle orogeneesille on arveltu Nazca ja Etelä-Amerikan laattojen liikenopeuksien eroa (Mora *ym.*, 2010). Keskimioseenina Andien juurelle oli muodostunut laaja Pebas-kosteikko, jolla oli ajoittain yhteys myös Karibian merelle (Irion & Kalliola, 2010; Mora *ym.*, 2010). Läntisessä Amazonissa joet laskivat pitkälti pohjoiseen. Andien juurella oleviin notkoihin kerääntyi vuorilta eroosion myötä jokien kuljettamaa sedimenttiä. Myöhäismioseenina notkot olivat täyttyneet äärimmilleen sedimentistä (Irion & Kalliola, 2010). Samoihin

aikoihin kohonnut Vaupésin kohouma sai joet laskemaan idästä kohti Brasilian rannikkoa Atlantiin (Mora *ym.*, 2010). Jokien mukana Andeilta peräisin olevaa ravinteikkaampaa maaperää kulkeutui laajalti Amazonian alueelle (Räsänen *ym.*, 1995). Geologisen historian myötä Amazonian maa-aineksen alkuperä ja tämän myötä myös ravinnepitoisuus vaihtelee suuresti alueittain (Tuomisto *ym.*, 2019).

2.2 Aineiston keruu

Tutkimuksessani minulla on käytössä sekä kasvimuseon tieteellisiin kokoelmiin kerättyjä prässätyjä näytteitä, että DNA:n eristystä varten kerättyjä kasvinäytteitä. Aineistoni DNA-materiaali on kerätty 2005–2020 Etelä- ja Väli-Amerikassa suoritetuissa linjalaskennoissa. Linjalaskentojen tarkoituksena on ollut muun muassa selvittää, mitä lajeja kasvaa missäkin. Tutkimuksen tueksi on kerätty kasvimuseoon meneviä prässätyjä näytteitä, joista lajimäärityksiä voidaan myöhemmin varmistaa. Näytteet jäävät myös pysyvästi kasvimuseon tieteellisiin kokoelmiin dokumentaatioksi löydetystä lajeista. Käyttämäni saniaisnäytteet ovat keränneet Hanna Tuomisto, Samuli Lehtonen ja Mirkka Jones ja ne on kerätty Brasiliasta, Panamasta, Perusta ja Ranskan Guayanasta. Käytän jatkossa näytteistä tunnisteita, jotka koostuvat kerääjän nimikirjaimista (HT, SL ja MJ), sekä hänen näytteellensä antamastaan keräysnumerosta.

Ennen kuin kasveja päästään prässäämään, säilytetään niitä maastotöiden ajan sanomalehtien välissä. Maasto-olosuhteet ovat hyvin kosteat, joten näytteet on homehtumisen estämiseksi käsitelty alkoholilla. Käsitteleminen kuitenkin estää myös DNA:n eristämisen näytteistä. DNA:n eristämiseen onkin kerätty erikseen pienempiä lehden palasia, jotka kuivataan kosteutta tehokkaasti itseensä imevällä silikageelillä. Näitä näytteitä on kerätty, jotta niiden DNA:n avulla voidaan tehdä lajien evoluutiohistoriaa ja sukulaisuussuhteita valottavaa tutkimusta. Näihin näytteisiin on kerätty materiaalia nuorista, mutta jo täysikokoisia lehdistä, sillä niiden DNA-pitoisuus on vanhoja lehtiä suurempi. Lisäksi niiden pinnalle on ehtinyt kertyä vasta vähän muuta sademetsän DNA-materiaalia, kuten pitkäikäisillä lehdillä epifyllinä kasvavia maksasammalia ja jäkäliä (Samuli Lehtonen ja Hanna Tuomisto, suullinen tiedoksianto 12.6.2024). Kaikki näytteet on kerätty sporofyyttikasveista, sillä gametofyyttejä on vaikea huomata maastossa, saati tunnistaa edes sukutasolla.

Tutkielmassani käyttämäni näytteet on jaoteltu ulkonäön ja kasvupaikan perusteella kolmeen alustavaan ryhmään: *T. pinnatum*, *T. sp. 1* ja *T. sp. 4*. Otan mukaan analyysiin myös lajin *Trichomanes vittaria* DC., joka *rbcL*-geeniin perustuvassa analyysissä todettiin tutkituista lajeista läheisimmäksi sukulaiseksi *T. pinnatum* -kompleksille ja *Trichomanes hostmannianum* (Klotzsch) Kunze -lajin, joka on *T. pinnatum* ja *T. vittaria* -lajiparin sisarlaji (Ebihara *ym.*, 2007; Dubuisson *ym.*, 2022). Ulkoryhmäksi otan lajin *Trichomanes cellulorum* Klotzsch, jonka aiemmin katsottiin kuuluvan sukuun *Abrodictyum*. Laji sijoittuu kuitenkin *rbcL*-geeniin pohjautuvassa fylogeneettisessä puussa keskelle *Trichomanes*-alasukun lajeja, kauas muista *Abrodictyum*-suvun edustajista. Laji vaikuttaakin tutkimuksen perusteella olevan sisarlaji *T. pinnatum*, *T. vittaria*, *T. hostmannianum* ja *Trichomanes botryoides* Kaulf. -lajien muodostamalle kladille ja kuuluvan *Trichomanes*-sukuun ja tämän samannimiseen alasukuun (Dubuisson *ym.*, 2022). Yhteensä tutkimuksessa käytettäviä näytteitä on 61 kpl, joista osasta on eristetty DNA jo aiemmin.

Kasviaineiston lisäksi käytän tutkimuksessani linjalaskentojen yhteydessä kerättyä maaperäaineistoa. Maastossa kerättiin tietoa ympäristömuuttujista sekä otettiin maaperänäytteitä edelleen analysoitavaksi. Näistä saatavia tietoja on käytetty tutkittaessa esimerkiksi lajien ekologiaa ja lajijhteisöjen vasteita maaperämuuttujiin.

Etelä-Amerikan linjalaskennoissa tasaisen maan linjoilta ja linjoilta, jotka sijaitsivat yhdellä rinteellä, maaperänäytteet otettiin tasaisesti ennalta määrätyiltä etäisyyksiltä. Jos linjalla oli useampi mäki, otettiin näytteet yleensä kahden mäen huipulta ja näiden välisestä laaksosta. Kultakin kohdalta otettiin 5 m × 5 m alueelta 0–5 cm syvyydeltä 5 osanäytettä, jotka muodostivat yhdessä näytteen. Näytteet ilmakeivattiin maastossa, jonka jälkeen säilytettiin muovipusseissa. Näytteiden kationipitoisuuksien analysointi tehtiin Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksella (MTT) Jokioisilla Suomessa. Analyysissä näytteistä eristettiin Ca, Mg ja K ionit 1-molaarisessa ammoniumasetaatissa pH:n ollessa 7. Menetelmät on kuvattu Tuomisto *ym.* (2003) artikkelissa.

Panamassa kukin otostus tehtiin 100 m × 100 m alueella, joiden sisällä tehtiin kaksi 100 m linjalaskentaa. Maaperänäytteet näiltä otettiin linjan korkeimmasta ja matalimmasta kohdasta. Molemmat näytteet koostuivat 20 osanäytteestä, jotka otettiin karikkeen poistamisen jälkeen 0–10 cm syvyydeltä. Näytteitä kuivattiin 45 °C:ssa 72 h. Tämän

jälkeen maaperäanalyysit tehtiin Smithsonian Tropical Research Institute (STRI) laitoksen maaperälaboratoriossa Panama Cityssä Panamassa. STRI käytti kationien eristämiseen Mehlich-III metodia (Jones *ym.*, 2013). Koska Panaman ja Etelä-Amerikan maaperänäytteiden analysointimenetelmät poikkesivat toisistaan, eivät arvot olleet suoraan verrattavissa keskenään. Tämän vuoksi osa Panaman maaperänäytteistä analysoitiin sekä STRI:ssa, että MTT:lla. Näiden pohjalta laskettiin lineaarisella regressioanalyysillä yhtälö, jolla saadaan STRI:n aineiston maaperämuuttujat Etelä-Amerikan vastaavien kanssa vertailukelpoisiksi (Lehtonen *ym.*, 2015).

Sain käyttöni linjalaskentojen yhteydessä kerätyn aineiston ekologisista muuttujista. Tiedot olivat useassa eri tiedostossa ja käytin näiden yhdistämiseen R-ohjelmaa (versio 4.3.3). Panaman aineistolle käytin kationisummaa, joka oli aiemmin kalibroitu vastaamaan muiden näytteiden analyysitavan antamia arvoja. Muille kuin Panaman näytteille laskin kationisumman. Käytin tähän Ca, Mg ja K ionien cmol(+)/kg-arvoja. Koska jokaista linjaa kohti, Panaman linjoja lukuun ottamatta, oli maaperäaineistoa sekä linjan alusta, keskeltä että lopusta, laskin kullekin erikseen näiden ionien cmol(+)/kg-arvot yhteen. Näistä kolmesta, linjan eri kohtia edustavista, kationisummista laskin keskiarvon. Näin sain siis kullekin linjalle yhden keskimääräisen kationisumma-arvon. Kationisummasta tein vielä kymmenkantaisen logaritmuunnoksen, sillä erot ravinnepitoisuuksissa ovat kasveille ekologisesti merkittävämpiä köyhemässä päässä ravinnegradienttia (Tuomisto *ym.*, 2003). Näytteistä kolme, HT 15437, HT 15286 ja HT 15285, on kerätty linjojen ulkopuolelta, joten niiden osalta minulla ei ole maaperäaineistoa käytettävänä.

2.3 DNA-menetelmät

2.3.1 DNA:n eristys

Eristin kaikista tutkimuksessani olevista kasvinäytteistä DNA:n myöhempää käsittelyä varten. DNA:n eristykseen käytin Macherey-Nagelin NucleoSpin® Plant II -eristyspakkausta ja sen ”Genomic DNA from plant” -menetelmää. Kustakin silikageelissä kuivatusta kasvinäytteestä taitoin pinseteillä noin 1 cm² palan materiaalia 1,5 ml mikrosentrifugiputkeen. Jäädytin näytteen laskemalla putken nestetyypen, minkä jälkeen hienonsin näytteen hiertämällä sitä putken pohjaa vasten nestetyypessä jäähdetyllä mikrosurvimella. Solujen hajottamiseksi pipetoin putkeen 400 µl PL1

puskuria ja sekoitin ravistelijassa noin 10 s ajan. Tämän jälkeen lisäsin putkeen 10 µl RNase A -liuosta ja sekoitin ravistelijassa uudelleen 10 s ajan. Sekoituksen jälkeen laitoin liuoksen 65 °C vesihauteeseen 10 min ajaksi.

Asetin pakkauksen mukana tulleen NucleoSpin®-suodatinputken 2 ml vetoisen keruuputken sisälle, jonka jälkeen pipetoin näyteliuoksen suodatinputkeen. Putket asetin sentrifugiin, jota ajoin 11 G teholla kahden minuutin ajan. Tämän myötä DNA siirtyi nesteen mukana suodattimen läpi keruuputkeen ylimääräisen kasvisolukon jäänteiden jäädessä suodattimelle. Liuoksen pipetoin uuteen 1,5 ml mikrosentrifugiputkeen varoen pipetoimasta pohjalla olevaa sakkaa.

Säädin DNA:n sitomisen olosuhteet lisäämällä liuokseen 450 µl PC-puskuria, jonka sekoitin nesteeseen ravistelijassa. DNA:n sidoin pipetoimalla 700 µl näyteliuosta uuteen keruuputken sisällä olevaan NucleoSpin® Plant II -suodatinputkeen. Putkia pyöritin sentrifugilla 1 min ajan. Tämän myötä liuoksessa oleva DNA jäi suodatinputken piidioksidikalvolle. Läpi tulleen liuoksen heitin pois.

Kalvolle jääneen DNA:n pesin lataamalla suodatinputkeen ensin 400 µl PW 1 -puskuria ja ajamalla tätä minuutin ajan sentrifugissa. Läpi tulleen nesteen heitin pois, minkä jälkeen lisäsin suodatinputkeen 700 µl PW 2 -puskuria ja sentrifugoin jälleen minuutin ajan. Läpi tulleen nesteen hävitin ja toistin saman vielä 200 µl:lla PW 2 -puskuria. DNA:n irrottamista varten siirsin suodatinputken nyt 1,5 ml mikrosentrifugiputkeen ja pipetoin siihen 50 µl 65 °C lämmitettyä PE-puskuria. Haudoin näytettä 5 min mekaanisessa 65 °C hauteessa ja ajoin sentrifugissa 1 min ajan. Toistin tämän vaiheen kerran. Lopputuloksena oli 100 µl DNA:n sisältämää liuosta, jonka siirsin pakkaseen säilytykseen.

2.3.2 DNA-alueiden valinta

Kloroplasti-DNA:ta (cpDNA) käytetään laajasti kasvien sukulaisuussuhteiden selvittämiseen (Taberlet *ym.*, 1991). Kloroplastin DNA on hyvä kasvisystematiikkaan, sillä se on haploidinen ja siinä ei ole rekombinaatiota, vaan se siirtyy suoraan toiselta vanhemmalta jälkeläiselle (Dong *ym.*, 2012). Yksi paljon käytetyistä cpDNA:n alueista on *rbcL*-geeni. Sen emäsjärjestyksen vaihtelu sukulaislajien välillä on kuitenkin verrattain vähäistä ja se riittääkin paremmin sukulaisuussuhteiden selvittämiseen heimotasolla (Small *ym.*, 2005). Koodaamattomat, geenien väliset alueet voisivat toimia

paremmin lähisukulaisten välejä selvitetessä (Taberlet *ym.*, 1991; Small *ym.*, 2005; Dong *ym.*, 2012). Geenien välisten alueiden mutaatioilla ei ole pääsääntöisesti vaikutusta eliön kelpoisuuteen, minkä takia niihin kertyy ajan myötä helpommin muutoksia, kuin konservatiivisiin, luonnonvalinnan kohteena oleviin geeneihin. Tämän takia etsin tutkielmaani geenien ulkopuolisia cpDNA:n alueita, joiden avulla lähdin näytteiden fylogeniaa rakentamaan.

Fylogeneettistä analyysia varten minun tuli valita sopivia alueita cpDNA:sta, joita lähden monistamaan näytteistä. Alueiden valintaa varten tarkastelin lähilajien cpDNA:ta Geneious Prime -ohjelmalla v. 2021.2.2. Koska *Trichomanes*-suvusta ei löydy kuin *Trichomanes trollii* Bergdolt (MH348274.1), jolta olisi koko kloroplastin DNA sekvensoituna, käytin alueiden valintaan cpDNA:ta *Trichomanes*-suvulle läheisen *Hymenophyllum*-suvun edustajilta: *Hymenophyllum barbatum* (Bosch) Baker (MN583334), *Hymenophyllum coreanum* Nakai (MN583335), *Hymenophyllum polyanthos* (Sw.) Sw. (MN583336) ja *Hymenophyllum wrightii* Bosch (MN583337).

Linjasin ensin cpDNA:t keskenään käyttäen Geneious Prime -ohjelman Geneious alignment -toimintoa oletusasetuksilla. Linjatuista DNA-juosteista etsin geenien välisiä alueita, jotka olisivat noin 1000 emäsparia pitkiä. Tämä on suunnilleen maksimipituus, joka voidaan Sanger-sekvensoinnilla käsitellä pätkimättä tarkasteltavaa aluetta useampaan osaan. Tämän jälkeen valitsin alueista ne, joissa oli eniten vaihtelua emäspareissa lajien välillä. Mikäli geenien välisillä alueilla olisi vaihtelua näiden samaan *Hymenophyllum*-sukuun kuuluvien lajien välillä, voisi olettaa, että myös *Trichomanes*-suvun sisällä eri lajeihin kuuluvilla yksilöllä olisi näillä alueilla enemmän vaihtelua. Tarkastelun perusteella päädyin valitsemaan kahdeksan lupaavalta vaikuttavaa geenien ulkopuolista aluetta (Taulukko 1).

2.3.3 Alukkeiden suunnittelu

Haluttujen cpDNA-alueiden eristämiseen kaikesta DNA-materiaalista tarvitsin alukkeita, joita käyttää polymeerasiketjureaktiossa (PCR). Alukkeiden suunnitteluun käytin internetissä olevaa, ilmaista Primer3web-ohjelmaa v. 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>) (Untergasser *ym.*, 2012) (käyty 13.2.2022). Käytin suunnitteluun *T. trollii* -lajin (MH348274.1) julkaistua kloroplastigenomia (Lehtonen, 2018). Alukkeet suunnittelin aiemmin valituille geenien välisille alueille siten, että ne kiinnittyisivät koodaaviin

geenialueisiin. DNA geenien sisällä on yleensä konservatiivisempaa, eli siinä on vähemmän geneettistä vaihtelua verrattuna geenien väliseen alueeseen. Näin varmistin, että alukkeet toimivat suuremmalla todennäköisyydellä kaikilla näytteillä. Suunnittelin alukkeet tarrautumaan lähelle geenien rajaa niin, että mahdollisimman suuri osuus monistettavaa DNA-materiaalia olisi geenien ulkopuolista DNA:ta. Tavoitteena oli myös, etteivät alukkeet kiinnittyisi muualle, kuin haluttuun kohtaan. Suunnittelemani alukkeet tilattiin Macrogen-yhtiöltä. Alukkeiden sekvenssit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Valitut cpDNA-alueet sekä niiden monistamiseen suunniteltujen alukkeiden sekvenssit. Lopulliset tutkimukseen valitut alueet on taulukossa lihavoitu.

| DNA-alue | alukkeen suunta | alukkeen juoste 5' → 3' |
|-------------------------------|-----------------|-------------------------|
| <i>petA – psbL</i> | vasen | TGCATCAGTCGTTTTAGCACA |
| | oikea | GGGATATTCTTTTACGGAGCCT |
| <i>psbA - matK</i> | vasen | GCGTCTTTCTAGAGTTGCGG |
| | oikea | CCGGACGTCCTGTTAGTAGA |
| <i>psbK - trnS-GCT</i> | vasen | GCTGCCGTGAGTTTTCGATA |
| | oikea | TTCGAATCCCTCTCTCTCCC |
| <i>rpoB - petN</i> | vasen | TCCGCATCTTGAATCTTTGGA |
| | oikea | ATAACCATCGAAGCAGCCCA |
| <i>rps4 - trnL-UAA</i> | vasen | GGCCTGGTAAATCTTTCAAACG |
| | oikea | GAGTCCGTAGCGTCTACCAT |
| <i>trne-TTC – psbZ</i> | vasen | TAGGCCTCTAGACGATGGGG |
| | oikea | TGTTGTCTTTTCAGGAGCGTC |
| <i>trnS-GGA – psbC</i> | vasen | GAGAGATGGTCGAGTGGCTT |
| | oikea | CGGGTTTGAGAAGGGGATTG |
| <i>ycf2 – psbA</i> | vasen | TGCATCAGTCGTTTTAGCACA |
| | oikea | GGGATATTCTTTTACGGAGCCT |

2.3.4 DNA-alueiden monistus

Kokeilin DNA-alueiden monistamista suunnittelemani alukkeilla. Tähän käytin kahta näytettä *Trichomanes sp. 4*, keruutunnus HT 15402, ja *T. pinnatum*, keruutunnus SL 867, jotka aiemmin tehdyn *rbcL*-geeniin pohjaavan fylogonian perusteella olivat mahdollisimman kaukaisia sukulaisia keskenään (Samuli Lehtonen, julkaisematon

aineisto). Näin todennäköisyys, että alukkeet toimisivat muihinkin tutkimukseni näytteisiin, olisi korkeampi.

Aloitin alukkeiden valmistelun laittamalla putket, joissa tilatut alukkeet olivat, minisentrifugiin, jotta kaikki DNA-materiaali olisi putkien pohjalla. Lisäsin kuhunkin alukeputkeen 300 µl ultrapuhdasta vettä (ddH₂O), jotta konsentraatioksi muodostui 100 pmol/µl. Käyttöön laimensin liuosta edelleen niin, että otin 10 µl alukeliuosta, johon lisäsin 90 µl ultrapuhdasta vettä. Tällöin alukkeiden konsentraatioksi tuli 10 pmol/µl. Loput alukeliuksesta jäi varastoon myöhempää käyttöä varten.

Käytin PCR:ään Cytivan valmistamia PuReTaq Ready-To-Go (RTG) PCR Beads -mikroputkia. Näissä on valmiina pakastekuivattuina helminä polymeerasiketjureaktioon tarvittavat aineet; kaikkia neljää deoksinukleosiditriposfaattia, DNA-polymeerasia, puskuriaineita, stabiloimisaineita sekä BSA:ta. Pipetoin kuhunkin mikroputkeen ensin 26 µl ultrapuhdasta vettä, jonka jälkeen pipetoin 1 µl alukeliuosta putken sisäreunalle ja toisen 1 µl saman DNA-alueen toista aluketta putken vastakkaiselle sisäseinälle. Lopuksi pipetoin putkeen 4 µl DNA-näyteliuosta. Kontaminaation varalta tein yhden kontrollinäytteen, johon pipetoin *ycf2 – psbA* DNA-alueen alukkeet, mutta DNA-näytteen sijaan lisäsin 4 µl ultrapuhdasta vettä. Putket pyöräytin vielä minisentrifugilla noin 10 s ajan, jotta alukkeet ja näytteen DNA-materiaali eivät jäisi putken reunoille, vaan sekoittuisivat veteen. Ajoin näytteet PCR:llä taulukon 2. mukaisin asetuksin.

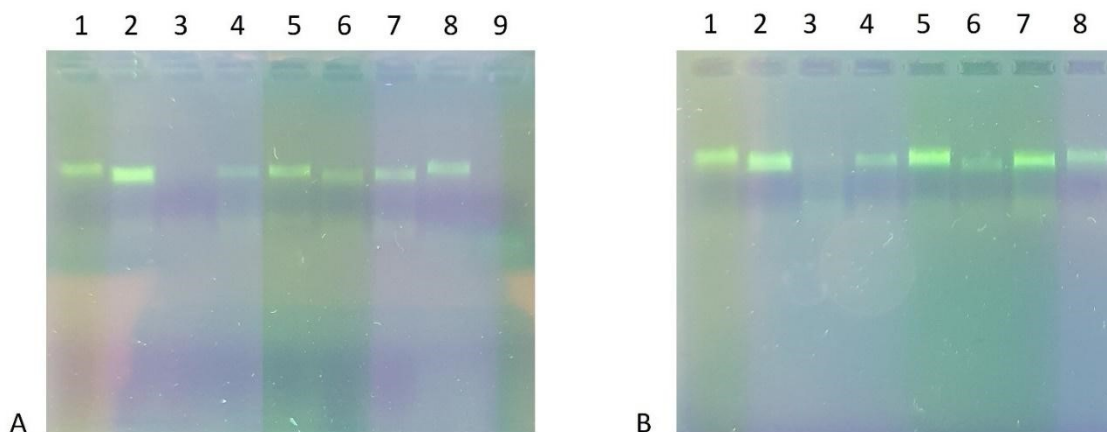
Taulukko 2. PCR-ajon asetukset

| Syklejä | vaihe | lämpötila | kesto |
|---------|------------------------|-----------|-------|
| 35 kpl | denaturaatio | 95 °C | 5 min |
| | alukkeiden liittyminen | 54 °C | 1 min |
| | pidentyminen | 72 °C | 1 min |

Tarkastelin PCR:llä monistettua DNA:ta ajamalla 1,7 µl kutakin PCR-tuotetta 15 min 90 V elektroforeesilla 1 % agarosigeelillä. Kaikki muut paitsi alukkeet DNA-alueelle *psbK – trnS-GCT* näyttivät toimivan (Kuva 1, kaivot A3 ja B3). Kontrollinäyte ei näkynyt geelillä (kaivo A9), joten PCR:n valmistelussa ei luultavasti tapahtunut kontaminaatiota.

Pipetoin näytteet uusiin putkiin sekvensoitavaksi lähettämistä varten. Tässä yhteydessä siirsin kuitenkin vahingossa SL 867 näytteestä peräisin olevat *rps4 – trnL-UAA* ja *trne*

TTC – psbZ -monistukset keskenään samaan putkeen. Näin ollen niitä ei voitu enää lähettää sekvensoitavaksi. Kaikki monistetut DNA-näytteet *psbK – trnS-GCT* -aluetta ja SL 867 näytteen *rps4 – trnL-UAA* ja *trne-TTC – psbZ* -alueiden monistuksia lukuun ottamatta lähetettiin MacroGen-yhtiölle (Amsterdam, Alankomaat / Soul, Etelä-Korea) sekvensoitaviksi.



Kuva 1. Elektroforeesilla 1 % agarosigeelillä ajettut testierät. Monistukset geelin puolella A ovat peräisin näytteestä HT 15402, joka alustavasti luokiteltiin ryhmään *Trichomanes sp. 4*. Geelin B puolella ovat monistukset näytteestä SL 867, joka luokiteltiin ryhmään *Trichomanes pinnatum*. Eri DNA-alueiden monistukset sijaitsivat geelillä seuraavasti: 1 = *petA – psbL*, 2 = *psbA – matK*, 3 = *psbK – trnS-GCT*, 4 = *rpoB – petN*, 5 = *rps4 – trnL-UAA*, 6 = *trne-TTC – psbZ*, 7 = *trnS-GGA – psbC*, 8 = *ycf2 – psbA*, 9 = kontrollinäyte.

2.3.5 Lopullisten DNA-alueiden valinta

Testierän sekvenssien perusteella valitsin kolme aluetta, jotka monistin kaikista kasvinäytteistä. Testierän sekvenssiaineistossa kustakin DNA-alueesta on juoste kumpaankin suuntaan luettuna. Avasin sekvensoidut DNA-juosteet BioEdit-ohjelmalla v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Tämän jälkeen käänsin vastinjuosteen samoin päin koodaavan juosteen kanssa. Valitsin molemmista juosteista osuudet, joissa DNA näytti kromatogrammissa selkeältä. Esimerkit hyvä- ja huonolaatuisesta sekvenssistä kromatogrammissa löytyy kuvasta 2. Kopioin nämä sekvenssipätkät uuteen ikkunaan ja linjasin ne keskenään käyttäen optimal GLOBAL alignment -toimintoa. Katsoin, onko kahden linjatun juosteen välillä eroavaisuuksia. Eroavat kohdat etsin alkuperäisistä kromatogrammeista. Näitä tarkastellessa toinen juosteista oli usein selkeämpi ja hyvälaatuinen, joten muokkasin poikkeavan emäksen toisessa juosteessa vastaamaan tätä parempilaatuista juostetta. Lopulta käytyäni koko linjauksen läpi, yhdistin nämä kaksi juostetta yhdeksi konsensusjuosteeksi. Tämän jälkeen vertasin näiden kahden näytteen kunkin DNA-alueen konsensusjuosteita keskenään linjaamalla ne samalla tavalla kuten

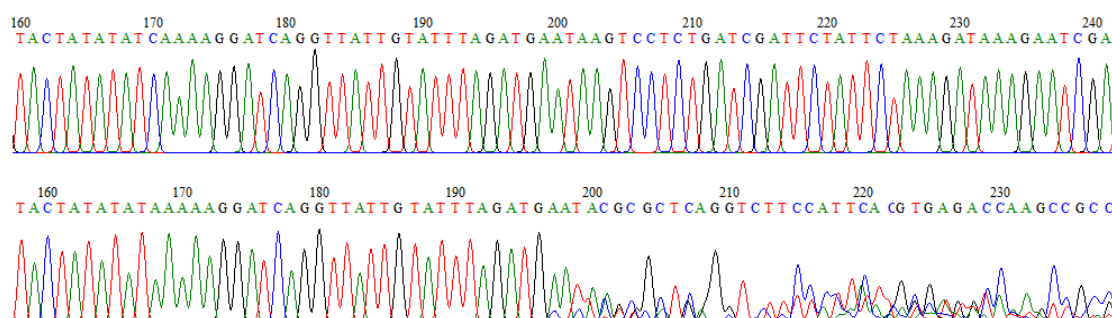
edellä, tarkoitukseni selvittää, mikä DNA-alue sisältää eniten vaihtelua näytteiden välillä.

Tutkimukseen päätyvien alueiden valinta ei ollut lopulta vaikeaa. Monistukset 1. alueesta *petA – psbL* näyttivät muuten onnistuneen hyvin, mutta B-näytteellä sekvenssin luku ei toiseen suuntaan ollut onnistunut ihanteellisesti — lukukelpoista sekvenssiä oli kromatogrammissa vain noin 200 emäksen pituudelta. BioEdit-ohjelma antaa näytteiden konsensusjuosteita linjatessa linjauksen ”identities”-arvoksi 0,86. Silmämääräisesti toisistaan poikkeavia kohtia näytteiden välillä oli 17. Tässä laskin yhdeksi poikkeamaksi kohdat, joissa yksi emäs tai emäsjono poikkesi linjattujen sekvenssien välillä tai joissa toisella juosteella oli yhden tai useamman emäksen pituinen aukko.

Alue 2, *psbA – matK*, oli molemmilla näytteillä molempiin suuntiin hyvälaatuista yli 700 emäksen pituudelta. BioEditin identities-arvo oli 0,96, silmämääräisesti poikkeavia kohtia oli 23. Aluetta 3 ei lähetetty sekvensoitavaksi. Alueen 4, *rpoB – petN*, sekvenssi oli ainoastaan B-näytteellä yhteen suuntaan luettuna lukukelpoista, muuten saatu aineisto oli tämän alueen osalta pelkkää sotkua. Tämän perusteella oli selvää, ettei tätä aluetta voi valita. Katsoin myös 5 ja 6 alueet A-näytteeltä, vaikkei näistä ollutkaan B-näytteeltä vastaavia käytössä. Alue 5 oli yhteen suuntaan hyvälaatuista noin 700 emäksen pituudelta, mutta toiseen suuntaan luettuna täysin lukukelvotonta. Myöskään 6 aluetta en olisi valinnut, vaikka B-näyte ei olisikaan mennyt pilalle. Alue näyttää yhteen suuntaan luettuna hyvältä, mutta toiseen suuntaan luettuna siinä on kohtalaisesti epäselvyyksiä oikeiden emästen osalta.

Alueella 7, *trnS-GGA – psbC* on A-näytteellä joitain epäselviä emäksiä yhteen suuntaan luettuna, mutta muuten molempien näytteiden osalta on noin 700 emäksen pituudelta hyvää sekvenssiä. Konsensusjuosteiden linjausten identities-arvo on 0,85 ja silmämääräisesti poikkeavia kohtia oli 18. Alue 8, *ycf2 – psbA*, A-näytteen osalta vaikutti hyvältä. Hyvälaatuista sekvenssiä oli yli 1000 emäksen mitalta molempiin suuntiin luettuna. Kuitenkin B-näytteellä toiseen suuntaan luettuna hyvälaatuista sekvenssiä oli vain alle 200 emäksen pituudelta, jonka jälkeen kromatogrammissa sekvenssi muuttui sotkuksi (Kuva 2). B-näytteestä ei saanutkaan aikaan kunnollista konsensusjuostetta. Linjattuna A-näytteen konsensusjuoste ja B-näytteen yhteen suuntaan luettu juoste saivat identities-arvon 0,70. Silmämääräisesti poikkeavia kohtia oli kuitenkin vain 11. Tämän

takia en valinnut myöskään tätä aluetta. Lopullisiksi tarkasteltaviksi alueiksi valikoitui siis *petA – psbL*, *psbA – matK* ja *trnS-GGA – psbC*. Monistin nämä kolme DNA-aluetta kaikista kasvinäytteistä, kuten edellä on kuvattu, ja lähetin sekvensoitavaksi Macrogen-yhtiölle.



Kuva 2. Yllä näytteen A sekvenssin kromatogrammia *ycf2 – psbA* -DNA-alueelta ja alla sama kohta näytteeltä B. Jälkimmäisestä kromatogrammista näkee selvästi, kuinka sekvenssiaineisto muuttuu lukukelvottomaksi hieman ennen 200. emästä.

2.4 Aineiston käsittely

2.4.1 Sekvenssiaineiston käsittely ja tarkastelu

Saatuani sekvenssiaineiston kolmelta DNA-alueelta kaikista näytteistä, siivosin ne kuten aiemmin. Yhdistin sekvenssit yhdeksi tiedostoksi tuomalla kaikkien näytteiden saman DNA-alueen sekvenssit BioEdit-ohjelmaan. Sekvenssit linjasin keskenään (multiple sequence alignment, MSA) verkkopohjaisella ClustalW-palvelulla (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Ajoin ohjelman ”slow/accurate”-asetuksella. Linjauksessa tehdään hypoteesi siitä, mitkä emäkset ovat keskenään homologisia.

Yhdistin kaikkien kolmen DNA-alueen linjatut sekvenssit samaan tiedostoon käyttäen SequenceMatrix 1.9 -ohjelmaa (Vaidya *ym.*, 2011). Asetin ulkolajiksi *T. cellulosum* -lajin, joka aiemman tutkimuksen mukaan on *T. pinnatum* -kompleksille käyttämistäni näytteistä etäisintä sukua (Dubuisson *ym.*, 2022). Kohinan vähentämiseksi kävin vielä linjatut sekvenssit läpi silmämääräisesti ja etsin kohtia, joissa jokin sekvenssi eroaa kaikista muista linjatuista sekvensseistä. Tarkastin nämä kohdat erikseen alkuperäisistä kromatogrammeista, ja korjasin, mikäli löysin korjattavaa. Jos kromatogrammin

perusteella oli epäselvää, mikä emäs kohdassa kuuluisi olla, käytin emästen monitulkintaisuuskoodeja.

Nähdäkseni onko eri DNA-alueiden tarjoama fylogeneettinen tieto yhdenmukaista keskenään, tein kullekin alueelle erikseen parsimonia-analyysilla sukupuun. Parsimonia-analyysissa tavoitteena on löytää puita, jotka käytetyn aineiston perusteella vaativat mahdollisimman vähän evolutiivisia askelia. Tällaisia askeleita voi olla esimerkiksi DNA:n emästen korvautuminen toisella ajan saatossa. Parsimonisin puu on sellainen, joka olettaa mahdollisimman vähän muutoksia tapahtuneen. Analyysia varten linjasin kunkin DNA-alueen sekvenssit käyttäen verkkopohjaista MAFFT-palvelua (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) (Madeira *ym.*, 2022). Tämän jälkeen ajoin kullekin alueelle erikseen parsimonia-analyysin käyttäen TNT-ohjelman graafista käyttöjärjestelmää wTNT:tä v. 1.6 (Goloboff & Morales, 2023). Analysoin ohjelmalla kunkin DNA-alueen ”traditional search” -toiminnolla ja loin tämän löytämistä parhaista puista tiukan konsensuspuun. Tässä konsensuspuussa puuhun hyväksytään vain sellaiset oksat, jotka ovat läsnä kaikissa konsensuspuuhun pohjana käytetyissä puissa. Puut avasin TreeViewer v. 2.2.0 -ohjelmalla (Bianchini & Sánchez-Baracaldo, 2024) tarkastelua varten. Juurrutin puut *T. cellulosum* -näytteen kanssa.

2.4.2 Sekvenssien valmistelu analyysia varten

DNA:n emäkset voidaan jakaa kahteen eri kemialliseen ryhmään; T ja C ovat kemiallisesti pyrimidiinejä, kun taas A ja G ovat puriineja. Kun DNA:n emäs korvautuu mutaatioissa toisella samaan ryhmään kuuluvalla emäksellä, kutsutaan tätä transitioksi. Jos korvaava emäs kuuluu toiseen ryhmään kuin alkuperäinen emäs, kutsutaan tätä transversiksi. Transitiot ovat yleisempiä kuin transversiot. Normaalisti DNA-juosteessa ei myöskään ole yhtä paljon kaikkia eri emäksiä, vaan näiden suhteelliset runsaudet vaihtelevat. Tällä on myös vaikutusta siihen, kuinka todennäköinen kukin mahdollinen emäsmuutos on (Aris-Brosou & Rodrigue, 2019). Tällaisia tekijöitä voidaan ottaa huomioon, kun rakennetaan DNA-aineistoon pohjautuvia fylogenioita. Tätä varten on kehitelty erilaisia, emästen korvautumista toisella kuvaavia evolutiivisia malleja.

Bayesilaista analyysia varten selvitin kullekin geenien väliselle DNA-alueelle sille parhaiten sopivan evolutiivisen mallin käyttäen JModelTest-ohjelmaa v. 2.1.10 (Darriba *ym.*, 2012). Valitsin mallin, jonka AIC-arvo oli pienin. Alueille *petA – psbL* ja *psbA –*

matK paras malli oli GTR + G -malli, kun taas *trnS-GGA – psbC* -alueelle GTR + I + G -malli oli paras. Eri DNA-alueiden mallien tukiarvot löytyvät liitteistä 1–3.

GTR (General Time Reversible) on malli, jossa jokaisella mahdollisella emäsparilla on oma muutostodennäköisyytensä. Nimensä mukaisesti mallissa ei ole väliä, kumpaan suuntaan ajassa muutoksia tarkastelee. Säännöt emästen muutoksille ovat siis samat molempiin suuntiin. Esimerkiksi todennäköisyys A-emäksen korvautumiselle G-emäksellä on sama kuin G:n korvautuminen A:lla. Malli on monimutkaisempi kuin esimerkiksi JC-malli (Jukes ja Cantor), jossa kaikkien emästen muutosten katsotaan olevan yhtä todennäköisiä. JC-malli onkin oletuksiltaan yksinkertainen eikä yleensä vastaa hyvin todellisuutta (Aris-Brosou & Rodrigue, 2019). Aineistolleni parhaiten sopiviksi valikoituneissa malleissa oleva G eli gamma-muuttuja vaikuttaa niin, että evoluutionopeus vaihtelee DNA-sekvenssin lokusten välillä (Gu *ym.*, 1995). Tämä lisää mallin realistisuutta, sillä evoluutionopeus ei tyypillisesti ole sama koko DNA:n pituudelta. Mallin I-muuttuja (invariant) taas antaa arvon emäksien osuudelle, jotka pysyvät ajan saatossa muuttumattomina (Gu *ym.*, 1995).

DNA-sekvenssejä keskenään linjatessa voi niihin jäädä usein aukkoja. Nämä johtuvat esimerkiksi lisäyksistä tai häviämistä, jotka ovat tapahtuneet DNA:ssa eliön evolutiivisen historian aikana. Aukot eivät siis ole oikeasti olemassa asioita, joita voisi nähdä eliön DNA:ta katsottaessa, vaan ne ovat havaittavissa vain tarkasteltaessa keskenään linjattuja sekvenssejä. Ne voivat kuitenkin tarjota samankaltaista tietoa eliöiden evoluutiohistoriasta, kuin muutkin muutokset emäsjärjestyksessä (Giribet & Wheeler, 1999). Aukkoaineistossa on muuta emäsaineistoa vähemmän homoplasiaa, joten sen tarjoama lisätieto voi olla arvokasta. Lisäyksiä ja häviämiä tapahtuu kaikkialla DNA:ssa, mutta ne ovat yleisempiä koodaamattomilla, geenien välisillä alueilla (Yuri *ym.*, 2013).

Aukkojen ottaminen mukaan fylogeneettiseen analyysiin voi vaikuttaa löydetyn puun topologiaan ja/tai se voi parantaa puun saamia tukiarvoja (Bateman *ym.*, 2003; Yuri *ym.*, 2013; Peloso *ym.*, 2016). Toisinaan taas aukkoaineiston hyödyntäminen ei muuta tutkimuksessa saatavaa lopputulosta (Werneck *ym.*, 2009; Pugh & Gilbert, 2018). Aukkoja ei kuitenkaan automaattisesti huomioida analyyseissa, vaan ne luetaan usein vain puuttuvana tietona (Machado *ym.*, 2021). Tällöin niiden mahdollisesti tarjoama lisätieto voikin jäädä tutkimuksessa hyödyntämättä. Maksimoidakseni DNA-

sekvensseistä irti saatavan informaation määrän, tein vielä matriisin, jossa on tiedot toisiinsa liitettyjen kolmen DNA-alueen linjausten aukkoista. Aukkoaineiston koostamiseen käytin FastGap-ohjelmaa v. 1.2 (Borchsenius, 2009). Ohjelma koodaa aukon esiintymisen kunkin sekvenssin osalta binäärisenä muuttujana. Mikäli joltain näytteeltä DNA-sekvenssiä ei ole kohdalta, jossa toisen näytteen sekvenssissä on aukko, koodaa ohjelma aukon esiintymistä koskevan tiedon puuttumisen kysymysmerkillä.

2.5 Bayesilainen analyysi

Rakensin valittuihin cpDNA-sekvensseihin ja niiden aukkoihin pohjautuvan fylogeniapuun MrBayes-ohjelmaa v. 3.2.7 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) käyttäen, sillä sen kanssa myös binäärisen aukkoaineiston liittäminen mukaan analyysiin onnistuu. MrBayes käyttää Bayesilaista päättelyä hyödyntäen Markovin ketju Monte Carlo -menetelmää.

Valmistelin aineiston analyysia varten osittamalla DNA-aineiston kolme eri aluetta käyttämään aiemmin näihin parhaiten sopiviksi havaittuja evolutiivisia malleja. Aukkoaineiston ositin käyttämään ”coding=variable” -funktiota. Asetin ajettavaksi kaksi samanaikaista Markovin ketjua ja niiden pituudeksi 10 miljoonaa kierrosta niin, että joka 1000. löydetty puu tallennetaan.

MrBayes-ajon loputtua ”Average standard deviation of split frequencies” -arvo oli 0,0049. Tarkastin Tracer v. 1.7.1 -ohjelmalla näiden ketjujen olleen hyvin konvergoituneet. Tarkastelin MrBayesin tekemää majority-rule -konsensuspuuta FigTree v. 1.4.4 -ohjelmassa (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) ja juurrutin puun *T. cellulosum* -lajilla. Konsensuspuu on laskettu molempien ketjujen löytämien puiden mukaan niin, että ajon löytämistä puista ensimmäiset 25 % on jätetty pois puuta rakennettaessa. Majority-rule -konsensuspuussa puuhun hyväksytään vain oksat, jotka esiintyvät yli 50 %:ssa kaikista rakentamiseen käytetyistä puista. Toistin vielä MrBayes-ajon samalla sekvenssiaineistolla ja asetuksilla ilman aukkoaineistoa. Tällä halusin selvittää, millainen merkitys aukkoaineistolla oli analyysin lopputulokseen. Konsensuspuiden perusteella tarkastelimme vielä kasvikoelmiin kerättyjen prässättyjen näytteiden morfologiaa.

Koska maaperän ominaisuudet ovat tärkeitä saniaisten levinneisyyden kannalta, laskin kullekin Bayesilaisen analyysin konsensuspuun oksalle tähän päätyneiden näytteiden

keruulinjojen logaritmuunnettujen kationisummien keskiarvon. Tutkin maaperän yhteyttä saniaisnäytteiden fylogeniaan visuaalisesti tekemällä kladogrammiin yhdistetyn kuvaajan, jossa näkyy kunkin näytteen keruulinjan kymmenkantaisen logaritmuunnoksen kationisumma sekä näiden oksakohtainen keskiarvo. Puun tuomiseen ja kuvaajan tekemiseen käytin R-paketteja dplyr, ggplot2 ja ggtree.

2.6 Karttojen teko

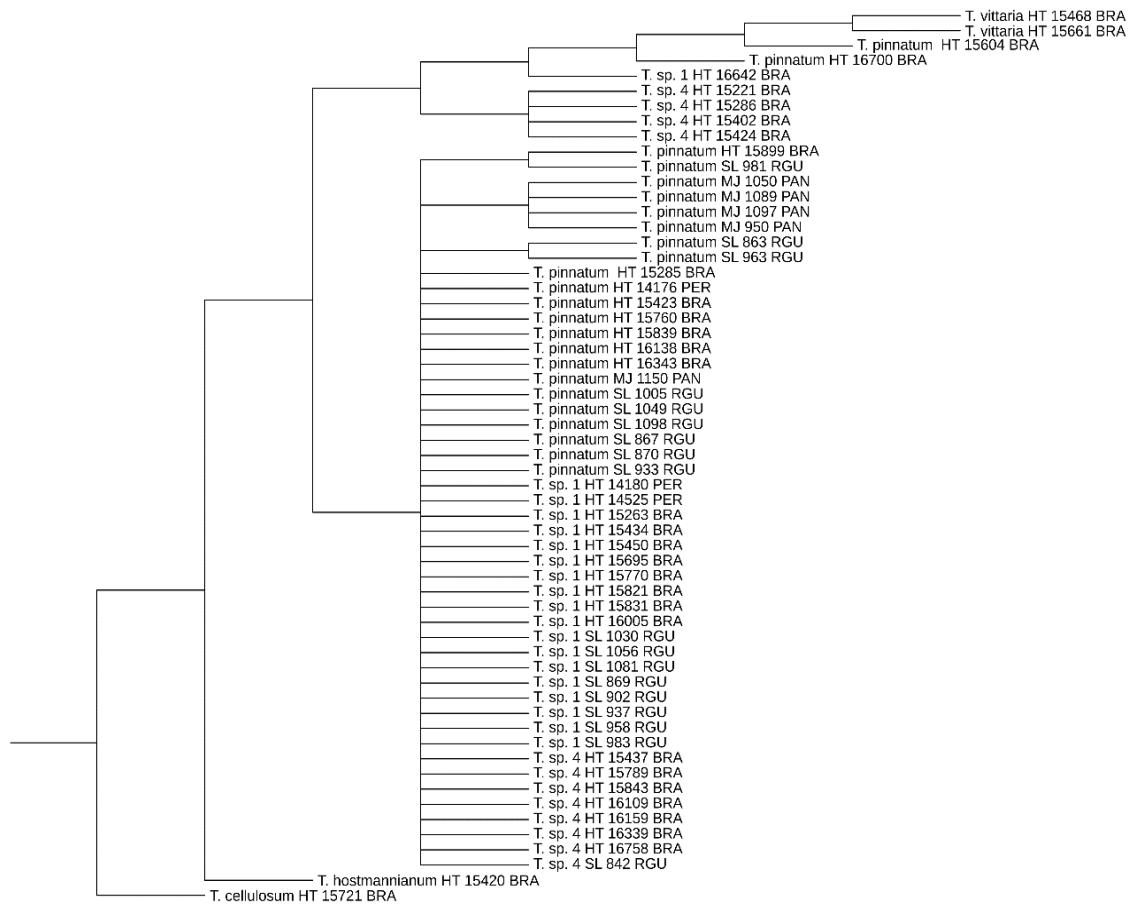
Tein kartat paikoista, joista kasvinäytteet on kerätty. Tähän käytin QGIS-ohjelmaa (versio 3.16.3-Hannover). Projektiona käytin EPSG:4326, koska se toimii hyvin päiväntasaajaa lähellä olevia alueita kuvattaessa. Linjoilta, joilta kasvinäytteet ja ekologinen aineisto on kerätty, on sekä alku-, loppu- että keskipisteen koordinaatit. Päädyin käyttämään näistä kustakin linjasta vain keskipisteen koordinaatteja. Panaman aineistossa olikin vain yksi sijaintipiste linjaa kohti. Koska usealta linjalta oli useampi kasvinäyte, päädyin hajauttamaan nämä pisteet kartalla, muuten pisteet olisivat menneet päällekkäin, eikä kartasta olisi hahmottanut kunnolla kaikkien näytteiden sijainteja. Hajautetut sijaintipisteet näkyvät kartalla pisterykelminä, jotka ovat toisissaan kiinni kaariviivoilla. Pisteet ovat sijoittuneet näiden alkuperäisen sijaintipisteen ympärille. Taustakarttana käytin Shuttle Radar Topography Mission (SRTM) topografiakarttatasoa sekä valtioiden rajat ja suurimmat joet sisältäviä vektoriaineistoja.

3. Tulokset

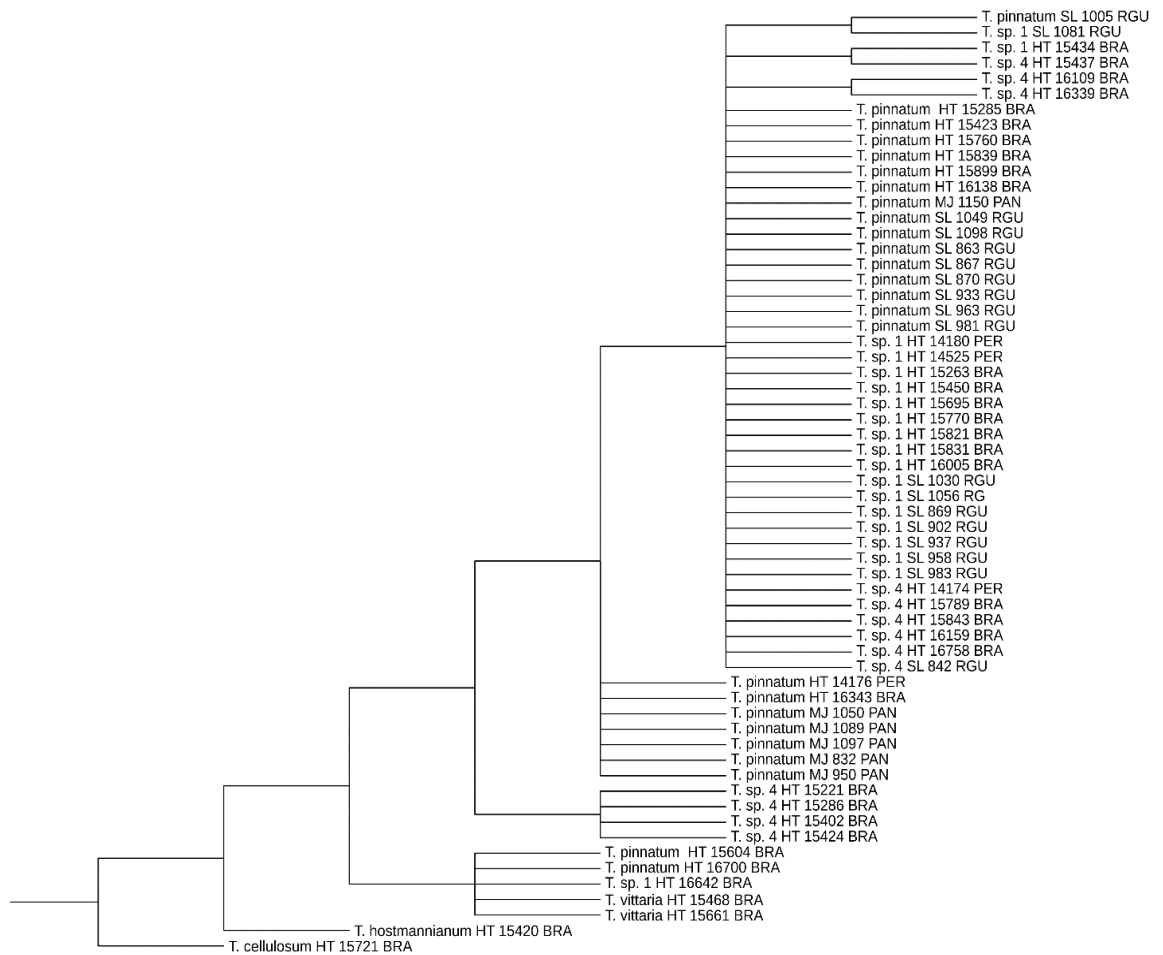
3.1 Parsimonia-analyysin konsensuspuut

Parsimonia-analyysia tehtäessä TNT-ohjelma löysi *petA* – *psbL* -alueelle 80 yhtä parsimonista puuta, joiden jokaisen pituutena oli 263 askelta. Alueen *psbA* – *matK* parhaita mahdollisia puita löytyi 30 kpl, näillä askeleita oli 168 ja *trnS-GGA* – *psbC* -alueelle yhtä hyviä puita löytyi 70 ja näiden pituus oli 335 askelta. Konsensuspuista (Kuvat 3, 4 ja 5) selviää, että jokaisen DNA-alueen suhteen samat *T. sp. 4* -taksoniin alustavasti luokitellut neljä näytettä muodostavat oman kladinsa ja molemmat *T. vittaria* -näytteet, sekä kaksi *T. pinnatum* -taksoniin määritettyä näytettä ja yksi *T. sp. 1* -näyte muodostavat yhdessä oman kladinsa. Panamalaisten näytteiden oksa toistui myös kahdessa kolmesta konsensuspuussa. Alueen *psbA* – *matK* puussa oksassa oli lisäksi kaksi Panaman ulkopuolista näytettä, kun taas *petA* – *psbL* -alueen puussa oksassa on ainoastaan panamalaisia näytteitä. MJ 832 -näyte puuttuu tästä puusta, sillä siitä ei saatu

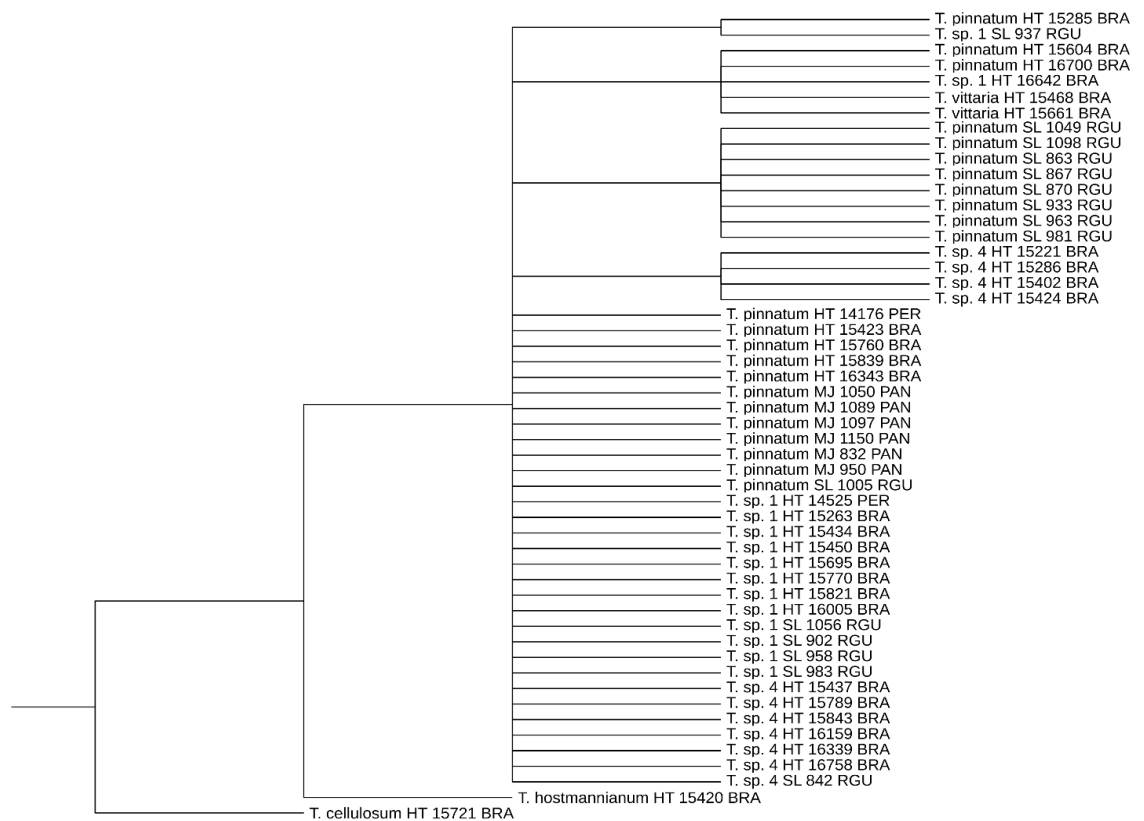
lukukelpoista sekvenssiä. Panamalaisista näytteistä MJ 1150 päätyy jokaisessa puussa erilleen muista ja osaksi suurta polytomiaa.



Kuva 3. *petA* – *psbL*-alueen parsimonia-analyysin tiukka konsensuspuu Näytteiden niminä on puussa näiden alustava taksonominen luokittelu, keruutunnus sekä maa tai alue, josta näyte on kerätty (BRA = Brasilia, PAN = Panama, RGU = Ranskan Guayana ja PER = Peru).



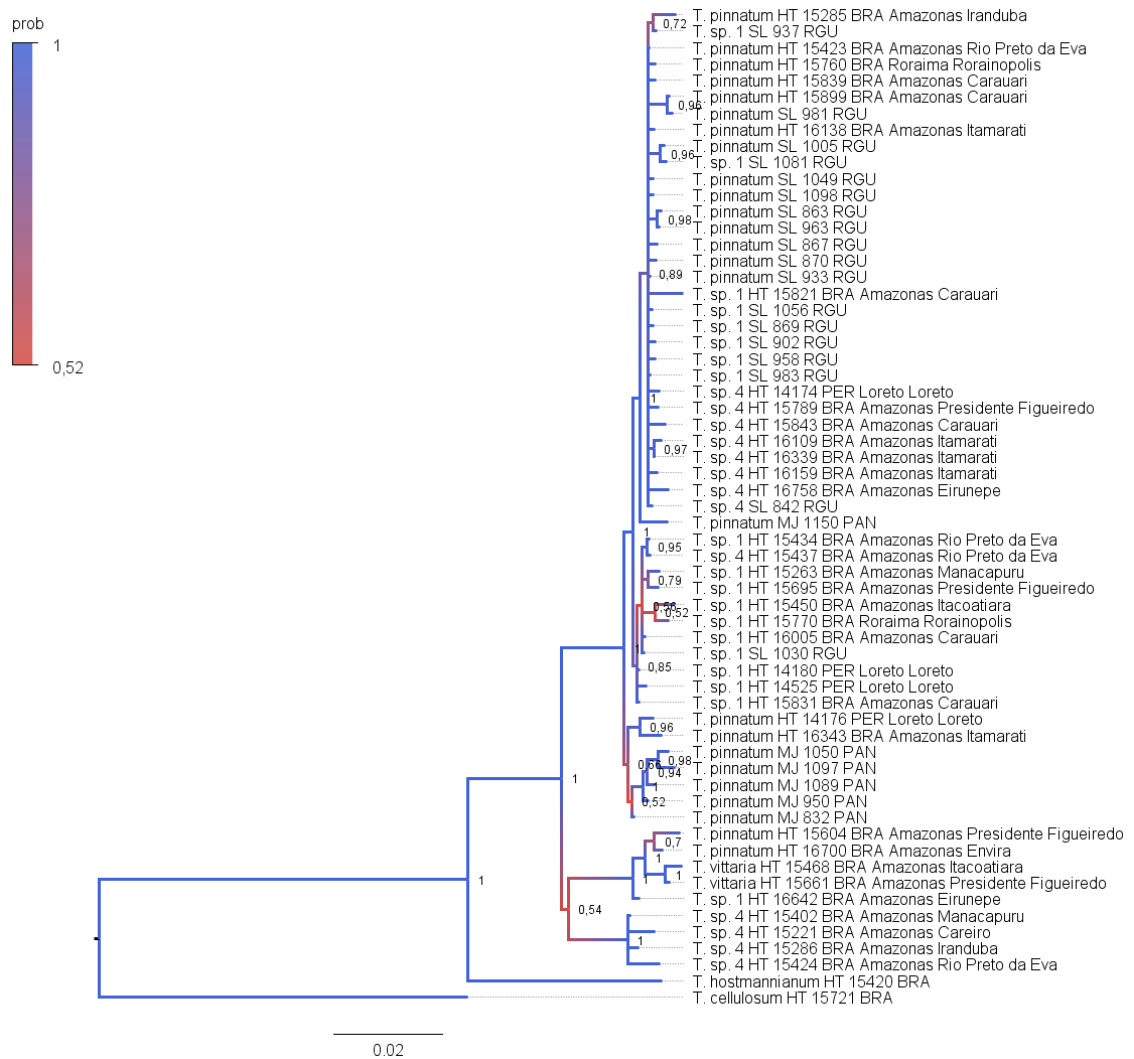
Kuva 4. *psbA – matK* -alueen parsimonia-analyysin tiukka konsensuspuu.



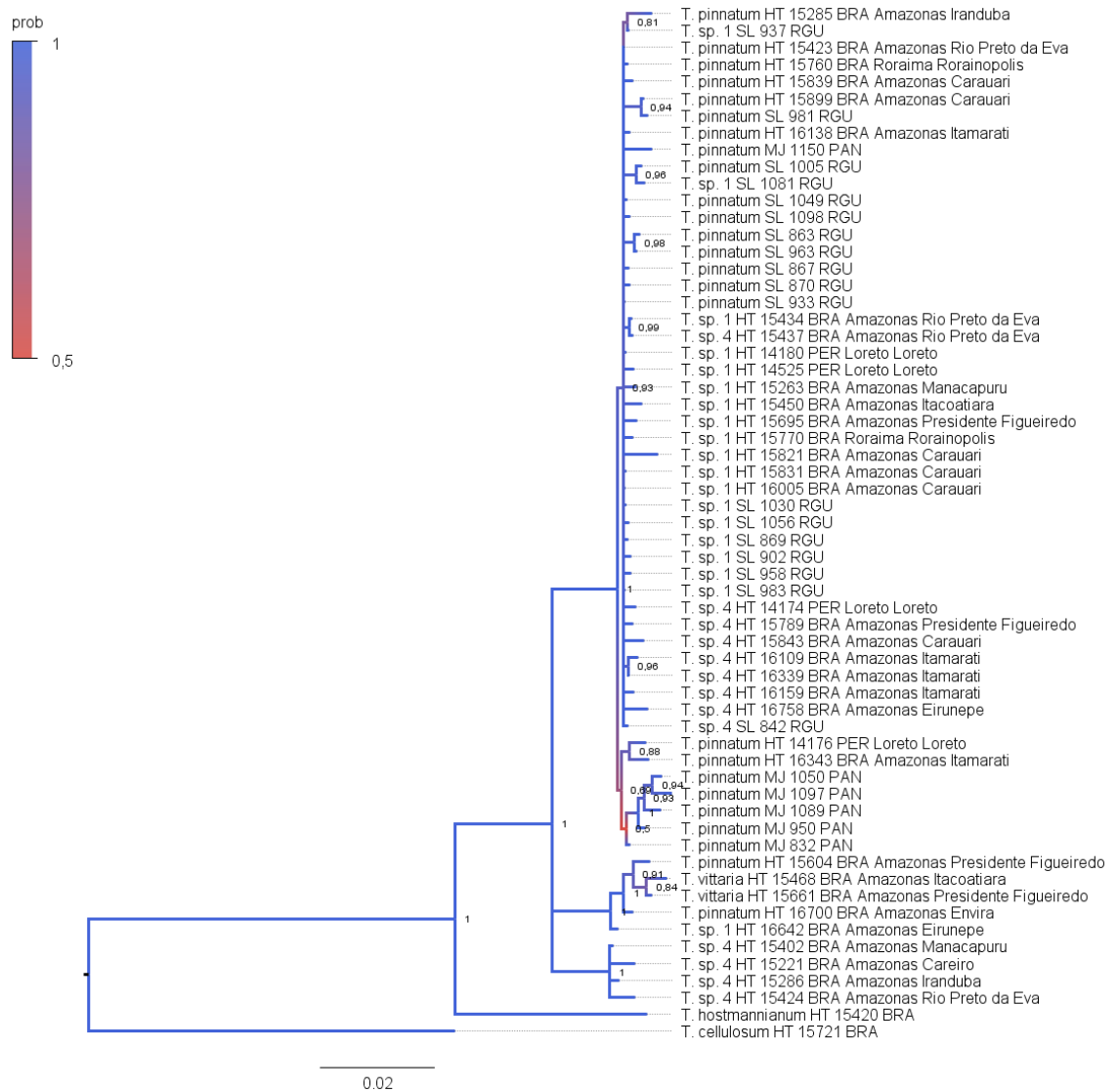
Kuva 5. *trnS-GGA – psbC* -alueen parsimonia-analyysin tiukka konsensuspuu.

3.2 Bayesilaisen analyysin konsensuspuut

Bayesilaisen analyysin tuottamassa majority rule -konsensuspuussa (Kuva 6) neljä *T. sp* 4 -ryhmään alun perin määritettyä näytettä muodostavat sisäryhmän *T. vittaria* -näytteille puun tyvellä. Omaksi oksakseen puussa erottuu myös Panamasta kerätyt näytteet, lukuun ottamatta MJ 1150 -näytettä.



Kuva 6. Kolmeen geenien väliseen cpDNA-alueeseen ja näiden linjauksessa löytyviin aukkoihin perustuva Bayesilaisen analyysin konsensuspuu. Näytteiden niminä on näille alustavasti annettu taksoni, keruutunnus ja maa tai alue, josta näyte on kerätty (BRA = Brasilia, PAN = Panama, RGU = Ranskan Guayana ja PER = Peru). Brasilialaisissa ja perulaisissa näytteissä on lisäksi tarkempi alue, jolta näyte on kerätty. Oksien pituudet kuvastavat evolutiivista etäisyyttä näytteiden välillä, väri kuvastaa jälkitodennäköisyyttä, eli sitä osuutta, kuinka monessa prosentissa analyysin löytämistä puista kyseinen oksa esiintyy.



Kuva 7. Ilman aukkoaineistoa tehdyn Bayesilaisen analyysin tuottama majority rule -konsensuspuu.

Ilman aukkoaineistoa ajetun Bayesilaisen analyysin antama majority rule -konsensuspuu (Kuva 7) on samankaltainen aukkoaineiston sisältävän puun kanssa. Molemmista puissa toistuvat samojen *T. sp. 4* -näytteiden oksa, joka asettuu *T. vittaria* -oksan sisareksi. Myös panamalaisten ja kahden Etelä-Amerikkalaisen näytteen oksa löytyy molemmista puista. Loput tarkastelluista näytteistä päätyvät ilman aukkoaineistoa ajetussa puussa kuitenkin osaksi suurta polytomista oksaa, kun taas aukkoaineistoa hyödyntävässä puussa erottuu vielä MJ 1150 omaksi yksinäiseksi oksakseen sekä *T. sp. 1* -näytteitä sisältävä oksa.

3.3 Prässättyjen näytteiden tarkastelu

Tarkastelimme prässättyjä kasvikokoelmanäytteitä kasveista, joista DNA oli eristetty. Bayesilaisen analyysin konsensuspuun tyvellä olevat, ryhmään *T. sp. 4* alustavasti määritetyt näytteet ovat ulkonäöltään yhdenmukaisia (Kuva 8). Kasvien fertiilit lehdet ovat leveitä ja näillä on kahdesta kolmeen kookasta, sivuille päin osoittavaa lehdykkää ja päätölehdykkä. Kasvien juurakot ovat pystymallisia.



Kuva 8. Bayesilaisen analyysiin konsensuspuun tyvelle sijoittuneet, alustavasti *Trichomanes sp. 4* -ryhmään luokitellut näytteet. Näytteillä juurakko on pysty ja fertiilit lehdet ovat kookkaita ja niissä on kahdesta kolmeen sivuille osoittavaa lehdykkää. Oksan näytteiden luokittelu muutettiin näytteiden tarkastelun ja Bayesilaisen analyysin tuottaman konsensuspuun perusteella *Trichomanes sp. 15* -ryhmäksi.

Panamalainen näyte keruukoodilla MJ 1150 (Kuva 9) poikkeaa ulkoisesti muista näytteistä, sillä se on näytteistä ainoa, jolla on steriilissä lehdessä yli 20 lehdykkäparia. Kasvilla on myös steriilin lehden kärjessä joitakin itiöpesäkkeitä. Näyte päätyi aukkoaineiston sisältävässä Bayesilaisen analyysin konsensuspuussa suuren polytomisen ryhmän sisaroksaksi.



Kuva 9. Panamasta kerätty näyte keruukoodilla MJ 1150. Prässättyssä näytteessä vasemmalla on steriili lehti ja oikealla fertiilit lehdet.



Kuva 10. Kuvassa vasemmalla on *Trichomanes vittaria* (keruutunnus HT 15468) ja oikealla näyte, joka alustavasti määritettiin ryhmään *Trichomanes pinnatum* (HT 15604). Lajilla *T. vittaria* fertiili lehti on tasasoukka ja liuskoittumaton, kun taas Bayesiläisen analyysin tuottamassa konsensuspuussa samaan oksaan päätyneellä näytteellä HT 15604 fertiili lehti on parilehdykkinen.

Bayesiläisen analyysin konsensuspuussa *T. vittaria* -näytteiden kanssa samaan oksaan päätyi kolme näytettä, jotka poikkeavat ulkoisesti tyypillisestä *T. vittaria* -lajin kasvusta. Näytteiden steriilit lehdet ovat samankaltaisia *T. vittaria* -lajin steriilien lehtien kanssa, mutta fertiilit lehdet ovat parilehdykkäiset, kun *T. vittaria* -kasveilla nämä ovat liuskoittumattomia (Kuva 10). Oksaan päätyneiden kasvien lehdykät ovat kuitenkin leveämmät kuin tyypillisellä *T. pinnatum* -kasvilla.

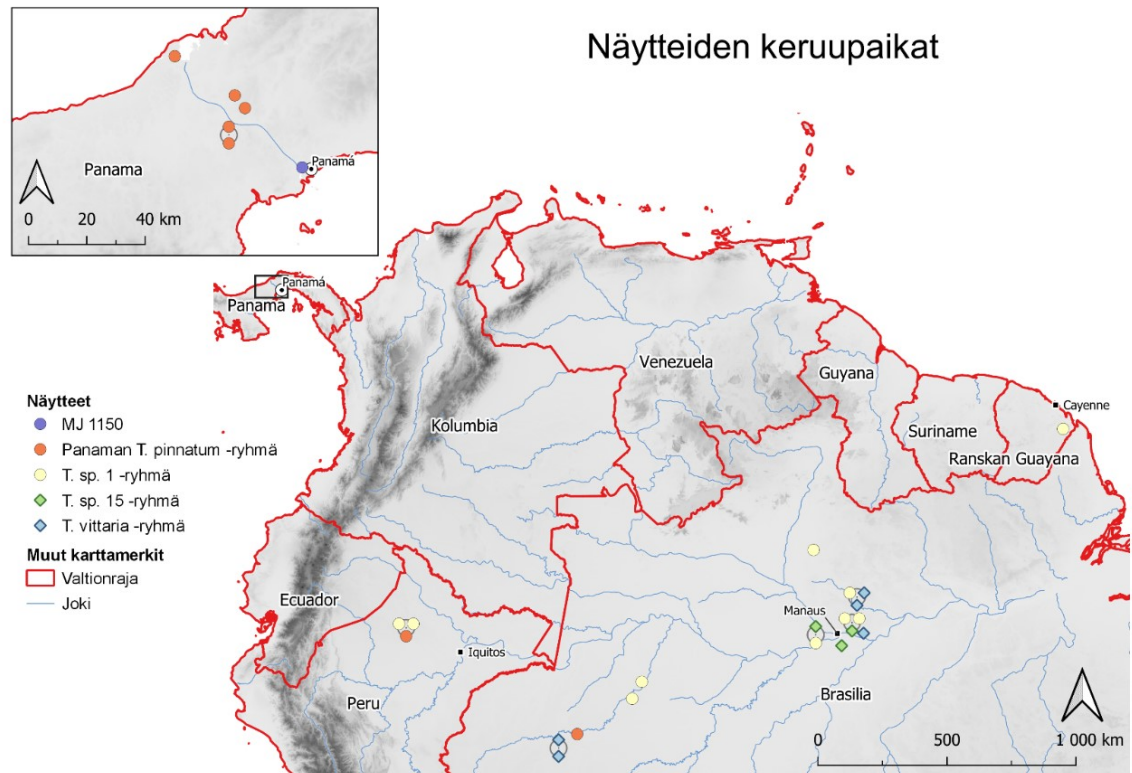
Näytteet, jotka päätyivät *T. sp. 1* -oksaan, ovat myös keskenään yhdenmukaisia. Näillä on vaakasuora roteva juurakko ja fertiilissä lehdessä usein kuudesta seitsemään sivulehdykkää ja päätölehdykkä (Kuva 11).



Kuva 11. Ryhmän *Trichomanes* sp. 1 kasveilla on vaakasuora, tukeva juurakko ja fertiilissä lehdessä usein 6–7 sivulehdykettä. Kuvassa näyte HT 15434.

Prässätyjen näytteiden ja Bayesilaisen analyysin tuottaman fylogrammin tarkastelun perusteella osan näytteistä alustavaa määrittystä muutettiin. Nämä olivat pääosin näytteitä, joiden kanssa oli alun perinkin epäselvää, kumpaan kahdesta eri vaihtoehdosta nämä luokiteltaisiin, esimerkiksi näytteen huonon juurakon takia. Fylogeniassa tyvelle sijoittuvan oksan alun perin *T. sp. 4* -ryhmään määritetyt neljä näytettä nimettiin uudelleen *T. sp. 15* -ryhmäksi, *T. sp. 1* -oksan yksinäinen *T. sp. 4* korjattiin *T. sp. 1* -taksoniksi ja muutamia näytteitä polytomisessa oksassa luokiteltiin myös uudelleen. Ohjaajani Hanna Tuomisto teki kaikki uudelleenmäärittäykset. Nämä on korjattu karttoihin ja kladogrammiin kuvissa 12, 13 ja 14.

3.4 Näytteiden maantieteellinen jakautuminen

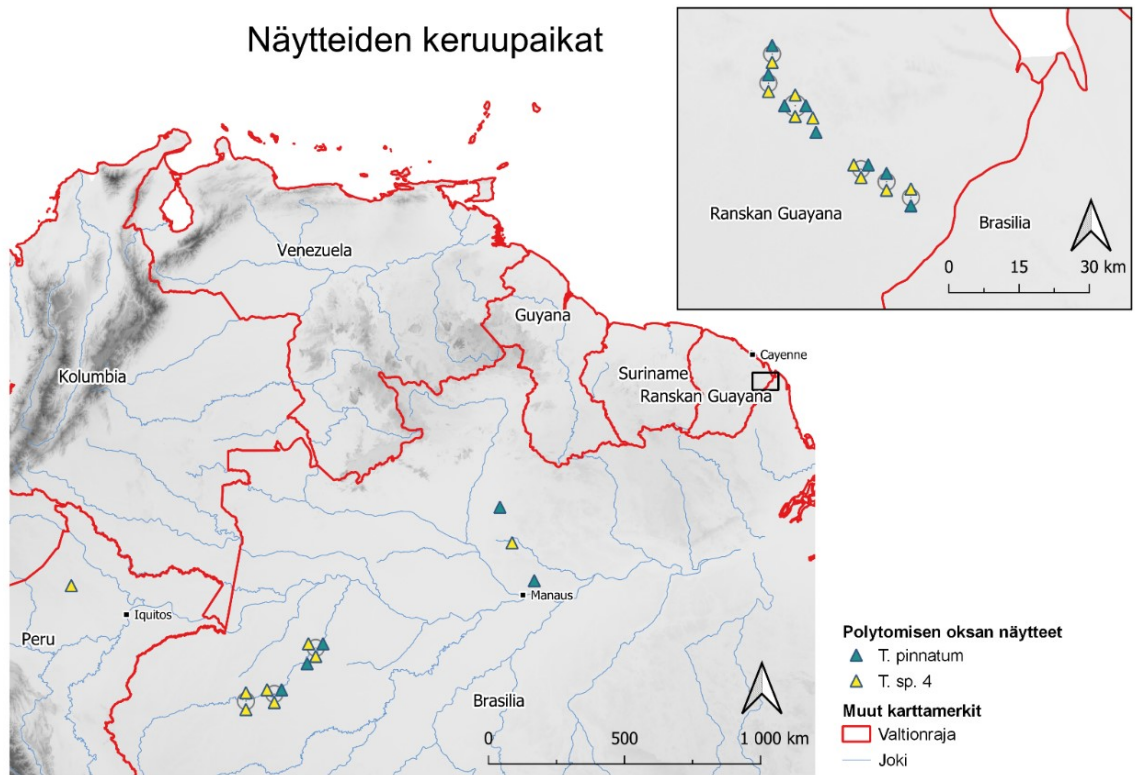


Kuva 12. Kartassa on sijainnit, joilta tutkimuksessa käytetyt näytteet on kerätty. Näytteet on ryhmitelty Bayesilaisen analyysin tuottaman konsensuspuun oksien mukaan. Andien vuoristo näkyy kartassa vasemmalla muuta ympäristöä tummempana.

Panamalaisista näytteistä puussa yksin esiintyvä MJ 1150 on kerätty aivan pääkaupunki Panamá'n vierestä (Kuva 12). Muut on kerätty Panaman kanavan molemmiin puolin keskeltä kannasta ja kannaksen pohjoisrannan läheltä. Panamalaisten näytteiden kanssa samaan oksaan päätyi myös kaksi näytettä, jotka on kerätty Brasilian Itamaratista ja Perun Loretosta.

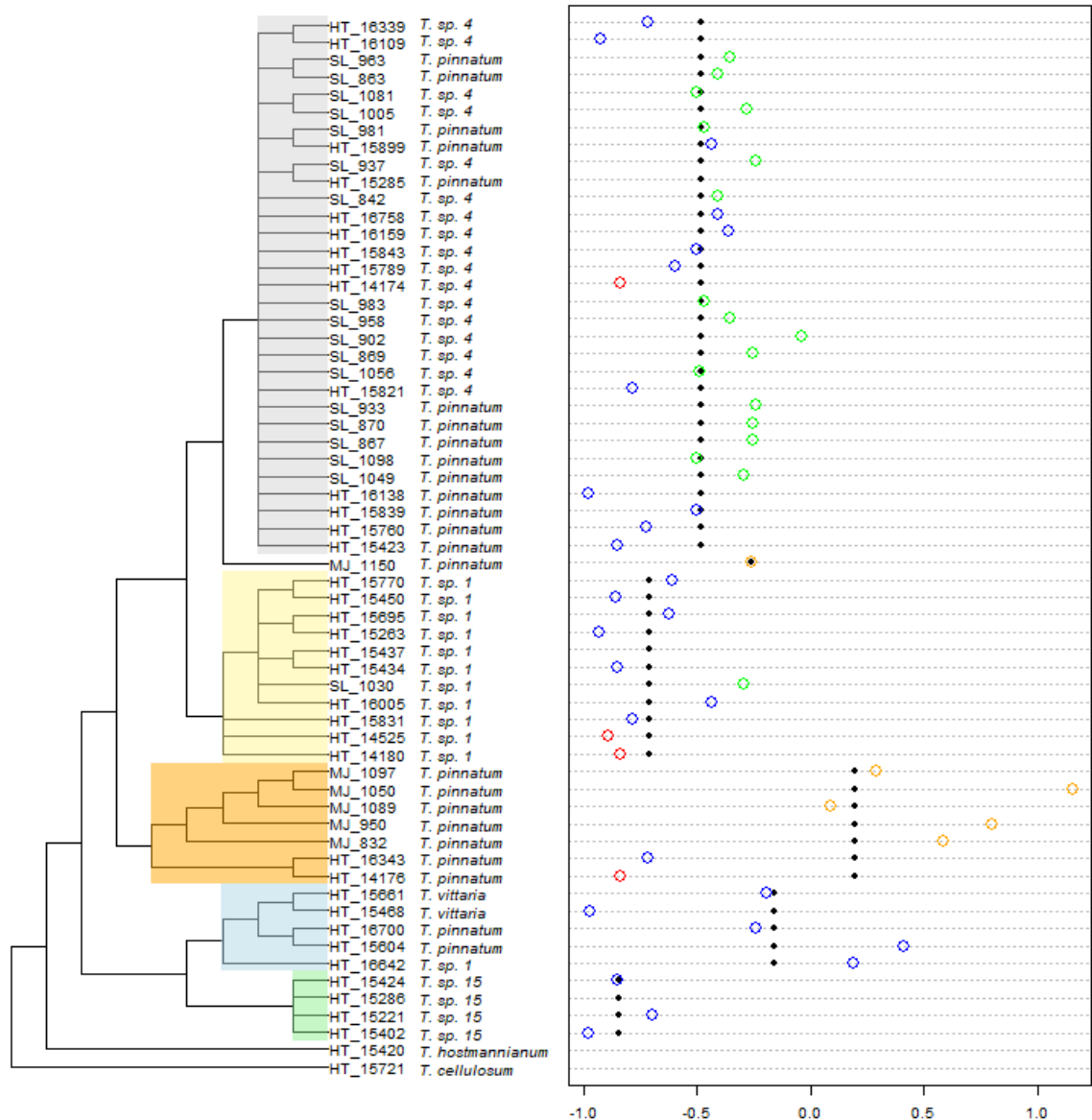
Ryhmän *T. sp. 1* näytteitä on kerätty laajalta alueelta ulottuen Ranskan Guayanasta Brasiliaan ja Peruun. Ryhmän *T. sp. 15* näytteet on kaikki kerätty eri paikoista, kuitenkin alle 100 km etäisyydeltä Manauksen kaupungista. Oksaan *T. vittaria* päätyneet näytteet olivat myös pääosin läheltä Manausta, mutta kaksi olivat Lounais-Amazoniasta — Envirasta (HT 16700) ja Eirunepestä (HT 16642). Valtaosa polytomisen oksan näytteistä oli kerätty Ranskan Guayanasta, yksi Perusta ja loput Brasiliasta (Kuva 13).

Näytteiden keruupaikat



Kuva 13. Kartassa on esiteltyä polytomisen oksan näytteiden keruupaikat. Kartassa näytteet on ryhmitelty noudattaen päivitettyjä luokitteluja, jotka perustuvat fylogeniaan ja kokoelmanäytteiden uudelleen tarkasteluun.

3.5 Kladien kationisummat



Kuva 14. Bayesilaisen analyysin tuottama kladogrammi, näytteiden keruulinjojen kationisummien kymmenkantaiset logaritimuunnokset sekä näiden oksakohtaiset keskiarvot. Puuhun on päivitetty kasvimuseoon kerättyjen näytteiden uudelleentarkastelussa korjatut määrittelyt. Puussa polytominen oksa on väritetty harmaalla, *Trichomanes sp. 1* -oksa keltaisella, panamalainen *T. pinnatum* -oksa oranssilla, *T. vittaria* -oksa sinisellä ja *T. sp. 15* -oksa vihreällä. Oikealla olevassa kuvaajassa värillisellä ympyrällä on merkattu kationisumman cmol(+)/kg-arvon kymmenkantainen logaritimuunnos linjalta, jolta näyte on kerätty. Ympyrän väri kuvaa maata tai aluetta, jolla linja sijaitsee; sininen kuvaa Brasiliaa, vihreä Ranskan Guayanaa, punainen Perua ja oranssi Panamaa. Musta ympyrä on oksakohtainen keskiarvo näistä arvoista. Muutamalta näytteeltä puuttuu linjakohtainen kationisumman arvo, sillä nämä olivat kerätty linjojen ulkopuolelta. Myöskään ulkolajeille ei ole esitetty arvoja.

Näytteiden keruulinjojen kationisummien kymmenkantaiset logaritimuunnokset ja näiden oksakohtaiset keskiarvot esittävässä kuvaajassa (Kuva 14) näkyy oksakohtaisten keskiarvojen olevan hyvin samankaltaiset polytomisen-, *T. sp. 1*- ja *T. sp. 15*-oksien kesken. *Trichomanes vittaria* -oksan ja panamalaisten näytteiden oksan keskiarvot erottuvat muita korkeampina. Näytteen MJ 1150 keruulinjan kationisumma oli Panaman

mittapuulla pieni. Näytteiden keruulinjojen kationisummien vaihteluväli on 0,11–14,27 cmol(+)/kg ($\log_{10} = -0,98-1,15$), matalin arvo on *T. sp. 15* -näytteellä HT 15402 ja korkein Panaman *T. pinnatum* -ryhmän näytteellä MJ 1050. Linjakohtaisia arvoja tarkasteltaessa Ranskan Guayanan arvot näyttävät olevan hieman tyypillisiä Brasilian arvoja korkeampia. Perun linjojen ravinnearvot aineistossa ovat matalia, kun taas Panamassa arvot ovat korkeita.

Koska Bayesilaisen analyysin tuottamassa konsensuspuussa oksat eivät vastanneet näytteiden morfologisesti määritettyjä alustavia ryhmiä, en voinut tehdä tilastollista analyysia kaiken olemassa olevan aineiston pohjalta, vaan pystyin käyttämään ekologista aineistoa vain näytteiltä, joista DNA oli eristetty. Näin ollen aineistoni otoskoko oli liian pieni oksien kationisummien tutkimiseen tarkempien tilastoanalyysien avulla.

4. Tulosten tarkastelu

Tutkimuksessa erityisen kiinnostavaksi tulokseksi nousi *T. sp. 15* -ryhmä, joka asettui fylogeniassa *Trichomanes vittaria* -ryhmän sisarokseksi. Ryhmän sijainti puun tyvellä ja sen oksan toistuminen jokaisessa parsimonia-analyysin puussa viittaa siihen, että kyseinen ryhmä on todennäköisesti oma lajinsa. Ryhmä näkyi myös *petA – psbL* -alueen parsimonia-analyysin tuottamassa puussa, vaikka DNA-alueella oli muuten huono erottelukyky. Kasvikokoelmiin kerätyt näytteet olivat myös ulkomuodoltaan yhdenmukaisia keskenään. Ryhmä saattaisikin täyttää sekä historiaan- että ominaisuuksiin perustuvien lajikonseptien kriteerit. Ryhmän näytteillä on fertiilissä lehdessään kahdesta kolmeen kookasta sivulehdykkää ja päätölehdykkä. Sekä *T. pinnatum*-, että *T. sp. 1* -kasvilla on fertiilissä lehdessä tyypillisesti enemmän sivulehdyköitä.

Kaikki *T. sp. 15* -näytteet oli kerätty alle 100 km päästä Manauksen kaupungista. Näytteiden keruulinjat olivat kaikki hyvin niukkaravinteisia. Tosin kasvien ollessa kerätty maantieteellisesti suppealta alueelta, on haastavaa sanoa, onko matala ravinnepitoisuus kasveilla vaatimus vai onko kyse vain spatiaalisesta korrelaatiosta. Kasveja, jotka *T. sp. 15* -näytteiden lailla alun perin määritettiin ryhmään *T. sp. 4*, on kerätty laajalta alueelta ympäri Amazoniaa. Kuitenkin vain nämä Manauksen läheltä kerätyt näytteet erottuivat systemaattisesti omaksi oksakseen. Ryhmän esiintymisalue voikin olla hyvin paikallinen.

Tutkimuksen DNA-materiaali on kerätty kuitenkin suhteellisen pieneltä määrältä tutkimuslinjoja. Ryhmän todellisen levinneisyyden selvittäminen vaatisikin vielä lisätutkimusta.

Bayesilaisen analyysin puussa huomion arvoista on myös *T. vittaria* -näytteiden sijoittuminen. Kaksi selkeästi *T. vittaria* -lajilta näyttävää näytettä muodostivat odotetusti sisarparin, mutta ryhmittäivät kahden, alun perin *T. pinnatum* -ryhmään luokitellun näytteen ja yhden *T. sp. 1* -ryhmään luokitellun näytteen kanssa samaan oksaan. Tämä oli näkyvässä jokaisesta DNA-alueesta erikseen tehdyissä parsimonia-analyysin konsensuspuussa, sekä molemmissa Bayesilaisen analyysin konsensuspuussa. Nämä kolme näytettä eroavat parilehdykkäisinä ulkoisesti *T. vittaria* -lajista, jolla on tyypillisesti liuskoittumaton ja tasasoukka fertiili lehti. Fertiilien lehtien lehdyköiden leveys kuitenkin vastasi enemmän tyypillisen *T. vittaria* -kasvin, kuin *T. pinnatum* -kasvin fertiilin lehden lehdykän leveyttä. Tässä ryhmässä voisikin ajatella olevan kyse hybrideistä, joissa *T. vittaria* on risteytynyt toisen lajin kanssa.

Lukuun ottamatta Panama-oksa, on *T. vittaria* -oksan näytteiden keruulinjojen keskimääräinen logaritimuunnettu kationipitoisuus muiden oksien arvoja korkeampi. Molemmat selvät *T. vittaria* -kasvit ovat kerätty ravinteisuudeltaan melko köyhiltä linjoilta. Muihin ryhmiin määritettyjen näytteiden linjojen korkeat kationisummat nostavat oksakohtaista keskiarvoa. Arvojen suuri vaihteluväli oksan sisällä viittaisi myös hybridikasveihin.

Tutkielman Bayesilaisen konsensuspuun perusteella ei voi vielä tietää kasvien todellista historiallista levittäytymishistoriaa. Mukana olleiden näytteiden perusteella vaikuttaisi kuitenkin siltä, että *T. vittaria*- ja *T. sp. 15* -ryhmät sisältävän oksan sisaroksassa yksi kehityslinja levittäytyi Panamaan ja toinen linja jäi Etelä-Amerikan alueelle. Kiinnostavaa on Panama-oksan tyvelle asettuvat näytteet, joita ei olla kerätty Panamasta vaan Perusta (HT 14176) ja Brasiliasta (HT 16343). Tämä on kiinnostavaa Andien muodostaman, ainakin osittaisen, dispersaaliesteen ja alueiden välisten maaperäerojen takia. Panamassa maaperä on hyvin ravinteikas verrattuna Perun ja Brasilian maaperiin. Tämä näkyy myös kationisummaa esittävässä kuvaajassa (Kuva 13). Panama-oksan keskiarvoa madaltaa Etelä-Amerikan puolelta kerättyjen näytteiden linjojen arvot.

Panama-oksan kokoelmanäytteistä ei tarkasteltaessa löydetty morfologisia piirteitä, joilla nämä erottaisi polytomiseen oksaan päätyneistä *T. pinnatum* -näytteistä. Merkittävä ero esiintymisalueiden maaperien ravinteisuudessa voisi kuitenkin viitata siihen, että Panama-oksan näytteet ovat oma lajinsa. Trooppisten saniaisten on aiemmin huomattu olevan ekologisilta lokeroiltaan tarkkoja maaperän suhteen (Tuomisto *ym.*, 1998, 2024; Zuquim *ym.*, 2014). On vaikea kuvitella, että sama *T. pinnatum*, joka esiintyy laajasti Amazonian maaperältään köyhillä alueilla, selviäisi ja pärjäisi kilpailulle myös Panaman ravinteikkaassa maaperässä. Koska kokoelmanäytteissä ei havaittu selkeitä morfologisia eroja panamalaisten ja Amazonian *T. pinnatum* -näytteiden väliltä, voi kyseessä olla kryptinen laji.

Puun perusteella ei pysty sanomaan, onko Panama-oksan kehityslinja levittäytynyt ensin Panamaan ja sitten takaisin Etelä-Amerikan puolelle, vai onko Perusta ja Brasiliasta kerättyjen näytteiden kehityslinja ikinä levittäytynyt Panamaan asti, jolloin leviäminen Panamaan olisi tapahtunut vasta myöhemmin linjan evolutiivisessa historiassa. Panama-oksan kasvien taksonominen status vaatisi lisätutkimusta. Etenkin Andien eteläpuolelta kerättyjen näytteiden tuma-DNA:n tarkastelu voisi selvittää, ovatko nämä Panamasta kerättyjen kasvien kanssa samaa ryhmää, vai esimerkiksi hybrideitä. Mikäli oksa on kehittynyt Panaman oloissa omaksi lajikseen, voi sen olla vaikea pärjätä Perun ja Brazilian Panamaa köyhemmällä maaperällä. Saniaisilla hybridejä voi kuitenkin syntyä ekologialtaan varsin erilaisistakin kantalajeista (Barrington, 1993). Puun perusteella vaikuttaisi levittäytymisen Amazoniasta Panamaan tapahtuneen tarkasteltavien näytteiden osalta ainakin kahdesti — ensin Panama-oksassa ja myöhemmin näytteen MJ 1150 osalta.

Aukkoaineiston sisältävässä Bayesilaisen analyysin konsensuspuussa omaksi oksakseen erottuu *T. sp. 1* -näytteet. Muista konsensuspuista oksaa ei löydy. Näytteet ovat kuitenkin keskenään morfologisesti yhdenmukaisia. Oksan näytteet on kerätty maantieteellisesti laajalta alueelta, joka ulottuu Ranskan Guayanasta Peruun. Ryhmän kasvit vaikuttavat viihtyvän varsin niukkaravinteisilla maaperillä — vain *T. sp. 15* -kasveilla keruulinjojen keskimääräinen kationisumma on matalampi.

Panama-oksan kasvit muodostavat sisäryhmän *T. sp. 1* -oksan, MJ 1150 -näytteen ja polytomisen oksan sisältävälle suuremmalle oksalle. Näytteen MJ 1150 sijainti puussa

viittaa myös siihen, että sen linja on päätynyt Panaman alueelle muiden panamalaisten näytteiden linjaa myöhemmin. Se myös kasvaa panamalaisittain karulla maaperällä. Etelä-Amerikkaan jääneestä linjasta erkaantui linja, joka kehittyi *T. sp. 1* -ryhmäksi, ja toinen linja, josta tapahtui taas uusi levittäytyminen Panamaan (MJ 1150) lopun linjasta, eli polytomisen oksan, jäädessä Etelä-Amerikan puolelle.

Yksinäinen Panaman MJ 1150 -näyte on kerätty linjalta, joka kationisummaltaan muistuttaa enemmän brasilialaisia linjoja, kuin linjoja, joilta muut panamalaiset näytteet on kerätty. Näyte ei erotu omaksi oksakseen missään yksittäistä DNA-aluetta tarkastelevassa parsimonia-analyysin tuottamassa konsensuspuussa, vaan ryhmittyy näissä osaksi suurta polytomista ryhmää. Olisi kiinnostavaa nähdä, onko näytteen MJ 1150 kaltaisia kasveja alueella lisää ja millaisilla maaperillä nämä kasvaisivat. Nyt käytettävissäni olleessa aineistossa tämä oli ainoa laatuaan, enkä näin ollen voi sanoa mitään näytteen mahdollisesta lajistuksesta. Näyte kuitenkin erosi perimältään muista taksonista sen verran, että se erottui omaksi oksakseen Bayesilaisen analyysin konsensuspuussa.

Tuloksissa valitettavaa on ison polytomisen oksan jääminen puuhun. Oksassa on kasveja, jotka ulkonäkönsä perusteella jaettiin alustavasti eri ryhmiin. Voi olla, ettei tutkimukseen valittujen DNA-alueiden sisällä ollut tarpeeksi vaihtelua, jotta mahdollisesti eri taksonisiin ryhmiin kuuluvat näytteet olisi saatu erotettua toisistaan. Kasvin ulkomuodon ja maaperän ravinteisuuden välillä ei myöskään silmämääräisesti vaikuta olevan yhteyttä. Olisi kiinnostavaa selvittää, löytyisikö esimerkiksi kasvupaikan kosteuden ja ulkomuodon väliltä johdonmukaista yhteyttä, jolloin kyse voisi olla fenotyypisistä plastisuudesta. On myös mahdollista, että ainakin osa polytomiseen oksaan päätyneistä näytteistä ovat hybridejä. Koska käytin tutkielmassani taksonien erotteluun uniparentaalisesti periytyvää kloroplastin DNA:ta, en voinut erottaa hybridejä muista kasveista. Tumagenomia tutkimalla hybridien verkkomaisia sukulaisuussuhteita olisi kuitenkin mahdollista selvittää (Tseng *ym.*, 2024; Keskiniva *ym.*, painossa). Hybridit ovat hyvin todennäköisiä myös *T. vittaria* -ryhmässä.

Polytomisen oksan keskimääräinen logaritmuunnettu kationipitoisuus on korkeampi, kuin *T. sp. 1*- ja *T. sp. 15* -oksilla. Yhtä *T. sp. 1* -ryhmään päätynyttä näytettä lukuun ottamatta, kaikki Ranskan Guayanasta kerätyt näytteet, joiden keruulinjan kationisumma

on kuvan 13 kuvaajassa esitetty vihreällä ympyrällä, päätyivät polytomiaoksaan. Näiden keruulinjojen kationipitoisuudet ovat pääosin hieman korkeampia, kuin muiden oksan näytteiden maaperien pitoisuudet.

En saanut valitsemillani cpDNA alueilla näytteitä eroteltua niin hyvin, kuin olisin toivonut. Valitsin tutkielmaani mahdollisimman vaihtelevat alueet käyttäen *Hymenophyllum*-suvun edustajien cpDNA-materiaalia. Voi olla, että alueiden vaihtelu ei ole yhtä suurta *Trichomanes*-suvun lajien välillä. On myös mahdollista, ettei näytteiden välillä ollut mahdollista saada suurempaa erottelukykyä hybridien myötä. Näytteiden tumagenomin tutkiminen olisikin looginen seuraava askel.

Alukkeet *petA – psbL* alueelle saivat kahta näytettä lukuun ottamatta kaikista monistettua halutun cpDNA pätkän. Parsimonia-analyysin tuottama puu kuitenkin ei tarjonnut paljoa tietoa näytteiden sukulaisuuksista. Ainoastaan *T. vittaria*- ja *T. sp. 15* -oksat erottuivat tällä alueella. Alue *psbA – matK* toimi tutkielmassa käytetyistä alueista parhaiten. Alukkeiden avulla sain jokaisesta näytteestä hyvälaatuista sekvenssiä. Lisäksi alueeseen pohjautuvan parsimonia-analyysin puun perusteella alueen DNA:ssa oli eniten vaihtelua näytteiden välillä. Alueen *trnS-GGA – psbC* alukkeilla DNA:n monistaminen toimi kolmesta tutkielmaan valituista alueista huonoiten. Usealla näytteellä lukukelpoista juostetta saatiin vain toiseen suuntaan luettuna. Yhdeksältä näytteeltä ei saatu ollenkaan lukukelpoista sekvenssiä ja osilla näytteistä lukukelpoinen sekvenssi oli hyvin lyhyt. Alueen alukkeiden toimivuutta olisi voinut mahdollisesti parantaa säätämällä PCR-ajon asetuksia. Pro gradu -tutkielman puitteissa laboratoriotöiden uudelleen tekeminen ei ollut kuitenkaan mahdollista.

Aukkoaineiston eli DNA:ssa evolutiivisen historian aikana tapahtuneiden emästen lisäysten ja häviämien huomioiminen voi parantaa analyysin erottelukykyä ja vaikuttaa analyysissä saadun puun topologiaan (Bateman *ym.*, 2003; Peloso *ym.*, 2016). Myös tässä tutkielmassa aukkoaineiston mukaan ottaminen osoittautui hyväksi ratkaisuksi. Ilman aukkoaineistoa ajatus Bayesilaisessa analyysissä *T. sp. 1* -oksan näytteet ja MJ 1150 -näyte päätyivät osaksi isoa polytomiaoksa. Aukkoaineisto mukaan ottamalla nämä saatiin eroteltua omiksi oksikseen.

Vaikka kasvikokoelmanäytteitä jo tarkasteltiin, olisi nämä hyvä käydä vielä uudelleen läpi ja katsoa, löytyykö eri oksiin päätyneiden näytteiden välillä systemaattisia morfologisia eroja. Esimerkiksi itiöpesäkkeiden rakennetta mikroskopoimalla voisi löytää uusia morfologisia tuntomerkkejä. Mikäli eroja löytyisi, voisi aiemmin kerätyt näytteet, joista ei ole DNA-aineistoa, ryhmittää uudelleen. Tämän jälkeen olisi mahdollista testata, eroaako näiden keruulinjojen kationipitoisuudet tilastollisesti toisistaan. Samoin tällöin voitaisiin mallintaa eri oksien näytteiden ekologisia lokeroita useamman eri ympäristömuuttujan suhteen ja katsoa eroavatko näiden ekolokerot toisistaan. Itiöpesäkkeiden avautumattomuus ja vaihtelu itiöiden koossa ja muodossa voisivat myös kieliä kasvin hybridistatuksesta (Barrington *ym.*, 1989).

Tutkielmani tulosten perusteella vaikuttaa, että *Trichomanes pinnatum* -lajikompleksin sisällä on yksi tai useampia tieteelle uusia lajeja. Erityisesti *Trichomanes sp. 15* vaikuttaa näytteiden ulkomuodon, oksan sijainnin ja yksittäisten cpDNA-alueiden parsimonia-analyysin tuottamien puiden perusteella potentiaaliselta omalta lajiltaan. Myös panamalainen oksa, *T. sp. 1* ja MJ 1150 -näyte vaatisivat lisätutkimusta. Yksi keino saada lisätietoa lajeista ja näiden hybrideistä olisi näytteiden tumagenomin tutkiminen; etenkin *T. vittaria*- ja polytomisen oksan osalta tästä voisi olla hyötyä. Mahdollisten lajihybridien selvittelyssä tumagenomin tutkimiseen voisi mahdollisesti käyttää DNA:n faausmenetelmiä. Lisäksi kokoelmanäytteiden itiöpesäkkeiden rakenteen mikroskopointi tai kromosomilukujen tutkiminen voisi olla hyödyllistä lajien erottelemisessa. Jatkotutkimuksia varten olisi hyvä saada myös lisää tutkittavia näytteitä.

Kiitokset

Suurimmat kiitokset ohjaajilleni Hanna Tuomistolle ja Samuli Lehtoselle kaikesta avusta ja siitä, että sain käyttää aineistoanne!

Suomen Biologian Seura Vanamo ry:lle kiitos tutkimukseni sekvensointikuluihin myönnetystä 1500 € apurahasta.

Venni Keskinivalle kiitos avusta Fastgapin ja MrBayesin kanssa, Kaiu Tammiselle ja Milla Aallolle yhteisistä kirjoitussessioista sekä Sami Merilaidalle ja graduryhmälle tekstini kommentoimisesta ja kirjoittamiseen motivoimisesta.

Inka ja Putte Kuusisto kiitos hyvistä parannusehdotuksista tekstiini liittyen ja kaikesta muusta avusta viimeisen vuoden aikana. Liisa Maanpää kiitos tekstini oikolukemisesta!

Kiitos myös Janne Merisaari kaikesta tuesta ja siitä, ettet avannut valmistumiseen ostettuja samppanjoita, vaikka tässä kesti tovi jos toinenkin.

Lähteet

- Alpert, P. & Simms, E. L. (2002) The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: When is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology*, **16**, 285–297.
doi:10.1023/A:1019684612767
- Aris-Brosou, S. & Rodrigue, N. (2019) A not-so-long introduction to computational molecular evolution. Teoksessa: *Evolutionary genomics statistical and computational methods* (toim. Anisimova, M.), 2. painos, s. 71–117. Humana Press, New York
- Bánki, O., Roskov, Y., Döring, M., Ower, G., Hernández Robles, D. R., Plata Corredor, C. A., Stjernegaard Jeppesen, T., Örn, A., Pape, T., Hobern, D., Garnett, S., Little, H., DeWalt, R. E., Ma, K., Miller, J., Orrell, T., Aalbu, R., Abbott, J., Adlard, R., ym. (2025). *Catalogue of Life* (Versio 2025-02-13). Catalogue of Life, Amsterdam, Alankomaat. [vierailtu 24.2.2025] doi:10.48580/dgnfb
- Barrington, D. S. (1993) Ecological and historical factors in fern biogeography. *Journal of Biogeography*, **20**, 275–279. doi:10.2307/2845635
- Barrington, D. S., Haufler, C. H. & Werth, C. R. (1989) Hybridization, reticulation, and species concepts in the ferns. *American Fern Journal*. **79**, 55–64. doi:10.2307/1547160
- Bateman, R. M., Hollingsworth, P. M., Preston, J., Yi-Bo, L., Pridgeon, A. M. & Chase, M. W. (2003) Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **142**, 1–40. doi:10.1046/j.1095-8339.2003.00157.x
- Baum, D. A. & Donoghue, M. J. (1995) Choosing among alternative "phylogenetic" species concepts. *Systematic Botany*, **20**, 560–573. doi:10.2307/2419810
- Bianchini, G. & Sánchez-Baracaldo, P. (2024) TreeViewer: flexible, modular software to visualise and manipulate phylogenetic trees. *Ecology and Evolution*, **14**, doi:10.1002/ece3.10873
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K. & Das, I. (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**, 148–155. doi:10.1016/j.tree.2006.11.004
- Bloesch, Z., Nauheimer, L., Almeida, T. E., Crayn, D. & Field, A. R. (2022) HybPhaser identifies hybrid

- evolution in Australian Thelypteridaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **173**.
doi:10.1016/j.ympev.2022.107526
- Borchsenius, F. (2009) FastGap ver 1.2. Biotieteiden tiedekunta, Aarhusin yliopisto, Tanska. Noudettu osoitteesta http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm
- Bradshaw, A. D. (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*, **13**, 115–155. doi:10.1016/S0065-2660(08)60048-6
- Brock, J. M. R. & Collier, K. (2020) Bat dispersal of fern spores in New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology*, **44**.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**, 772. doi:10.1038/nmeth.2109
- Dennis, A. B. & Hellberg, M. E. (2010) Ecological partitioning among parapatric cryptic species. *Molecular Ecology*, **19**, 3206–3225. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04689.x
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L. & Zhou, S. (2012) Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PloS one*, **7**.
doi:10.1371/journal.pone.0035071
- Dubuisson, J.-Y., Héban-Mauri, R. & Galtier, J. (1998) Molecules and morphology: conflicts and congruence within the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae), **9**, 390–397.
- Dubuisson, J.-Y., Hennequin, S., Bary, S., Ebihara, A. & Boucheron-Dubuisson, É. (2011) Anatomical diversity and regressive evolution in trichomanoid filmy ferns (Hymenophyllaceae): a phylogenetic approach. *Comptes Rendus - Biologies*, **334**, 880–895. doi:10.1016/j.crv.2011.07.009
- Dubuisson, J.-Y., Péchon, T. L., Hennequin, S., Rouhan, G., Salino, A., Deblauwe, V., Droissart, V., Tuomisto, H., Lehtonen, S. & Ebihara, A. (2022) New insights into the diversity, taxonomy and history of the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae, Polypodiidae), with a focus on Africa and the western Indian Ocean. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **198**, 215–239.
doi:10.1093/botlinnean/boab049
- Ebihara, A., Dubuisson, J.-Y., Iwatsuki, K., Hennequin, S. & Ito, M. (2006) A taxonomic revision of Hymenophyllaceae. *Blumea: Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography*, **51**, 221–280.
doi:10.3767/000651906X622210
- Ebihara, A., Iwatsuki, K., Ito, M., Hennequin, S. & Dubuisson, J.-Y. (2007) A global molecular phylogeny of the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae) with special reference to stem anatomy. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **155**, 1–27. doi:10.1111/j.1095-8339.2007.00684.x
- Giribet, G. & Wheeler, W. C. (1999) On Gaps. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**, 132–143.
- 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
- Gu, X., Fu, Y.-X. & Li, W.-H. (1995) Maximum likelihood estimation of the heterogeneity nucleotide of substitution rate among sites. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 546–557.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 95–98.
- Hennequin, S., Schuettpelz, E., Pryer, K. M., Ebihara, A. & Dubuisson, J.-Y. (2008) Divergence times and

- the evolution of epiphytism in filmy ferns (Hymenophyllaceae) revisited. *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 1278–1287. doi:10.1086/591983
- Hervías-Parejo, S., Olesen, J. M., Nogales, M., Traveset, A. & Heleno, R. (2019) Dispersal of fern spores by Galápagos finches. *Journal of Ornithology*, **160**, 831–833. doi:10.1007/s10336-019-01656-9
- Hirzel, A. H., Hausser, J., Chessel, D. & Perrin, N. (2002) Ecological-niche factor analysis: How to compute habitat-suitability maps without absence data? *Ecology*, **83**, 2027–2036. doi:10.1890/0012-9658(2002)083[2027:ENFAHT]2.0.CO;2
- Hopkins, M. J. G. (2007) Modelling the known and unknown plant biodiversity of the Amazon Basin. *Journal of Biogeography*, **34**, 1400–1411. doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01737.x
- Irion, G. & Kalliola, R. (2010) Long-term landscape development processes in Amazonia. Teoksessa: *Amazonia: landscape and species evolution a look into the past* (toim. Hoorn, C. & Wesselingh, F.), 1. painos., s. 185–197. Wiley-Blackwell, Hoboken
- Jones, M. M., Ferrier, S., Condit, R., Manion, G., Aguilar, S. & Pérez, R. (2013) Strong congruence in tree and fern community turnover in response to soils and climate in central Panama. *Journal of Ecology*, **101**, 506–516. doi:10.1111/1365-2745.12053
- Keskiniva, V., Tuomisto, H. & Lehtonen, S. (2024) *Danaea* (Marattiaceae) keeps diversifying, part 2: Phylogeny and identification key for 81 taxa. *Willdenowia*, **53**, 229–255. doi:10.3372/wi.53.53304
- Keskiniva, V., Lehtonen, S., Testo, W., Consortium, GoFLag & Tuomisto, H. (painossa) Rampant hybridization in an old tropical fern genus (*Danaea*, Marattiaceae).
- Kessler, M. (2010) Biogeography of ferns. Teoksessa: *Fern ecology* (toim. Mehlreter, K., Walker, L. R. & Sharpe, J. M.), 1. painos, s. 22–60. Cambridge University Press, Cambridge
- Kinosian, S. P., Pearse, W. D. & Wolf, P. G. (2020) Cryptic diversity in the model fern genus *Ceratopteris* (Pteridaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **152**, 106938. doi:10.1016/j.ympev.2020.106938
- Kirby, M. X., Jones, D. S. & MacFadden, B. J. (2008) Lower miocene stratigraphy along the Panama Canal and its bearing on the Central American peninsula. *PLoS ONE*, **3**. doi:10.1371/journal.pone.0002791
- Kreft, H., Jetz, W., Mutke, J. & Barthlott, W. (2010) Contrasting environmental and regional effects on global pteridophyte and seed plant diversity. *Ecography*, **33**, 408–419. doi:10.1111/j.1600-0587.2010.06434.x
- Kroonenberg, S. B. & de Roever, E. W. F. (2010) Geological evolution of the Amazonian craton. Teoksessa: *Amazonia: landscape and species evolution a look into the past* (toim. Hoorn, C. & Wesselingh, F.), 1. painos., s. 9–28. Wiley-Blackwell, Hoboken
- Lehnert, M. & Krug, M. (2019) Evolution of substrate specificity and fungal symbiosis in filmy ferns (Hymenophyllaceae): a Bayesian approach for ambiguous character state reconstruction. *Symbiosis*, **78**, 141–147. doi:10.1007/s13199-018-00594-z
- Lehtonen, S. (2018) The complete plastid genome sequence of *Trichomanes trollii* (Hymenophyllaceae). *Nordic Journal of Botany*, **36**, doi:10.1111/njb.02072
- Lehtonen, S., Jones, M. M., Zuquim, G., Prado, J. & Tuomisto, H. (2015) Phylogenetic relatedness within

- Neotropical fern communities increases with soil fertility. *Global Ecology and Biogeography*, **24**, 695–705. doi:10.1111/geb.12294
- Lima, L. V., Oliveira, U., Almeida, T. E., Bueno, M. L. & Salino, A. (2020) Migration barriers in ferns: the case of the neotropical genus *Diplazium* (Gleicheniaceae). *Plant Ecology and Diversity*, **13**, 401–412. doi:10.1080/17550874.2021.1890259
- Liu, H. M., Russell, S. R., Vogel, J. & Schneider, H. (2018) Inferring the potential of plastid DNA-based identification of derived ferns: a case study on the *Asplenium trichomanes* aggregate in Europe. *Plant Systematics and Evolution*, **304**, 1009–1022. doi:10.1007/s00606-018-1529-9
- Machado, D. J., Castroviejo-Fisher, S. & Grant, T. (2021) Evidence of absence treated as absence of evidence: The effects of variation in the number and distribution of gaps treated as missing data on the results of standard maximum likelihood analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **154**, doi:10.1016/j.ympev.2020.106966
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A. & Lopez, R. (2022) Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, **50**, 276–279. doi:10.1093/nar/gkac240
- Mellado-Mansilla, D., Testo, W., Sundue, M. A., Zotz, G., Kreft, H., Coiro, M. & Kessler, M. (2022) The relationship between chlorophyllous spores and mycorrhizal associations in ferns: evidence from an evolutionary approach. *American Journal of Botany*, **109**, 2068–2081. doi:10.1002/ajb2.16094
- Mora, A., Baby, P., Roddaz, M., Parra, M., Brusset, S., Hermoza, W. & Espurt, N. (2010) Tectonic history of the Andes and sub-Andean zones: implications for the development of the Amazon drainage basin. *Teoksessa: Amazonia: landscape and species evolution a look into the past* (toim. Hoorn, C. & Wesselingh, F.), 1. painos, s. 38–60. Wiley-Blackwell, Hoboken
- Nakayama, H., Sinha, N. R. & Kimura, S. (2017) How do plants and phytohormones accomplish heterophylly, leaf phenotypic plasticity, in response to environmental cues. *Frontiers in Plant Science*, **8**, doi:10.3389/fpls.2017.01717
- Nitta, J. H., Meyer, J. Y., Taputuarai, R. & Davis, C. C. (2017) Life cycle matters: DNA barcoding reveals contrasting community structure between fern sporophytes and gametophytes. *Ecological Monographs*, **87**, 278–296. doi:10.1002/ecm.1246
- Nitta, J. H., Watkins, J. E., Holbrook, N. M., Wang, T. W. & Davis, C. C. (2021) Ecophysiological differentiation between life stages in filmy ferns (Hymenophyllaceae). *Journal of Plant Research*, **134**, 971–988. doi:10.1007/s10265-021-01318-z
- Peloso, P. L. V., Frost, D. R., Richards, S. J., Rodrigues, M. T., Donnellan, S., Matsui, M., Raxworthy, C. J., Biju, S. D., Lemmon, E. M. Lemmon, A. R. & Wheeler, W. C. (2016) The impact of anchored phylogenomics and taxon sampling on phylogenetic inference in narrow-mouthed frogs (Anura, Microhylidae). *Cladistics*, **32**, 113–140. doi:10.1111/cla.12118
- PPG I (2016) A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal of Systematics and Evolution*, **54**, 563–603. doi:10.1111/jse.12229
- Pryer, K. M., Smith, A. R., Hunt, J. S. & Dubuisson, J.-Y. (2001) *rbcL* data reveal two monophyletic groups of filmy ferns (Filicopsida: Hymenophyllaceae). *American Journal of Botany*, **88**, 1118–1130.

doi:10.2307/2657095

- Pugh, K. D. & Gilbert, C. C. (2018) Phylogenetic relationships of living and fossil African papionins: combined evidence from morphology and molecules. *Journal of Human Evolution*, **123**, 35–51. doi:10.1016/j.jhevol.2018.06.002
- Raynor, G. S., Ogden, E. C. & Hayes, J. V. (1976) Dispersion of fern spores into and within a forest. *Rhodora*, **78**, 473–487.
- Rieseberg, L. H. & Willis, J. H. (2007) Plant speciation. *Science*, **317**, 910–914. doi:10.1126/science.1137729
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572–1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180
- Rothfels, C. J., Johnson, A. K., Hovenkamp, P. H., Swofford, D. L., Roskam, H. C., Fraser-Jenkins, C. R., Windham, M. D. & Pryer, K. M. (2015) Natural hybridization between genera that diverged from each other approximately 60 million years ago. *American Naturalist*, **185**, 433–442. doi:10.1086/679662
- Ruokolainen, K., Linna, A. & Tuomisto, H. (1997) Use of Melastomataceae and pteridophytes for revealing phytogeographical patterns in Amazonian rain forests. *Journal of Tropical Ecology*, **13**, 243–256. doi:10.1017/S0266467400010439
- Räsänen, M. E., Linna, A. M., Santos, J. C. R. & Negri, F. R. (1995) Late Miocene tidal deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*, **269**, 386–390.
- Schneider, H. (2000) Morphology and anatomy of roots in the filmy fern tribe Trichomanaceae H. Schneider (Hymenophyllaceae, Filicatae) and the evolution of rootless taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **132**, 29–46. doi:10.1006/bojl.
- Schneider, H., Schuettpelz, E., Pryer, K. M., Cranfill, R. B., Magallon, S. A. & Lupia, R. (2004) Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature*, **428**, 553–557. doi:10.1038/nature02361
- Seehausen, O. (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 198–207. doi:10.1016/j.tree.2004.01.003
- Sharpe, J. M., Mehltreter, K. & Walker, L. R. (2010) Ecological importance of ferns. Teoksessa: *Fern ecology* (toim. Mehltreter, K., Walker, L. R. & Sharpe, J. M.), 1. painos, s. 1–21. Cambridge University Press, Cambridge
- Small, R. L., Lickey, E. B., Shaw, J. & Hauk, W. D. (2005) Amplification of noncoding chloroplast DNA for phylogenetic studies in lycophytes and monilophytes with a comparative example of relative phylogenetic utility from Ophioglossaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**, 509–522. doi:10.1016/j.ympev.2005.04.018
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105–1109.
- ter Steege, H., ATDN & RAINFOR (2010) Contribution of current and historical processes to patterns of tree diversity and composition of the Amazon. Teoksessa: *Amazonia: landscape and species evolution a look into the past* (toim. Hoorn, C. & Wesselingh, F.), 1. painos, s. 349–359. Wiley-Blackwell, Hoboken

- Thomas, W. W. (1999) Conservation and monographic research on the flora of tropical America. *Biodiversity and Conservation*, **8**, 1007–1015. doi:10.1023/A:1008857429787
- Todesco, M., Pascual, M. A., Owens, G. L., Ostevik, K. L., Moyers, B. T., Hübner, S., Heredia, S. M., Hahn, M. A., Caseys, C., Bock, D. G. & Rieseberg, L. H. (2016) Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications*, **9**, 892–908. doi:10.1111/eva.12367
- Tryon, R. M. (1948) Some *Woodsias* from the north shore of Lake Superior. *American Fern Journal*, **38**, 159. doi:10.2307/1545173
- Tryon, R. M. (1970) Development and evolution of fern floras of oceanic islands. *Biotropica*, **2**, 76–84. doi:10.2307/2989765
- Tryon, R. M. (1972) Endemic areas and geographic speciation in tropical American ferns. *Biotropica*, **4**, 121–131.
- Tseng, Y.-H., Kuo, L.-Y., Borokini, I. & Fawcett, S. (2024) The role of deep hybridization in fern speciation: examples from the Thelypteridaceae. *American journal of botany*, **111**, e16388. doi:10.1002/ajb2.16388
- Tuomisto, H. & Ruokolainen, K. (1994) Distribution of Pteridophyta and Melastomataceae along an edaphic gradient in an Amazonian rain forest. *Journal of Vegetation Science*, **5**, 25–34. doi:10.2307/3235634
- Tuomisto, H., Poulsen, A. D. & Moran, R. C. (1998) Edaphic distribution of some species of the fern genus *Adiantum* in western Amazonia. *Biotropica*, **30**, 392–399. doi:10.1111/j.1744-7429.1998.tb00073.x
- Tuomisto, H., Poulsen, A. D., Ruokolainen, K., Moran, R. C., Quintana, C., Celi, J. & Cañas, G. (2003) Linking floristic patterns with soil heterogeneity and satellite imagery in Ecuadorian Amazonia. *Ecological Applications*, **13**, 352–371.
- Tuomisto, H., Zuquim, G. & Cárdenas, G. (2014) Species richness and diversity along edaphic and climatic gradients in Amazonia. *Ecography*, **37**, 1034–1046. doi:10.1111/ecog.00770
- Tuomisto, H., Van Doninck, J., Ruokolainen, K., Moulatlet, G. M., Figueiredo, F. O. G., Sirén, A., Cárdenas, G., Lehtonen, S. & Zuquim, G. (2019) Discovering floristic and geoeological gradients across Amazonia. *Journal of Biogeography*, **46**, 1734–1748. doi:10.1111/jbi.13627
- Tuomisto, H., Suominen, L., Alonso, A., Cárdenas, G., Lehtonen, S., Moulatlet, G. M., Pérez, E., Sirén, A., Weigelt, P. & Zuquim, G. (2024) Species–soil relationships across Amazonia: niche specificity and consistency in understorey ferns. *Journal of Vegetation Science*, **35**, e13307. doi:10.1111/jvs.13307
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012) Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, **40**, 1–12. doi:10.1093/nar/gks596
- Vaidya, G., Lohman, D. J. & Meier, R. (2011) Cladistics multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, **27**, 171–180.
- Wagner, W. H. & Wagner, F. S. (1977) Fertile-sterile leaf dimorphy in ferns. *The Gardens' bulletin, Singapore*, **30**, 251–267
- Watkins, J. E., Churchill, A. C. & Holbrook, N. M. (2016) A site for sori: ecophysiology of fertile–sterile leaf dimorphy in ferns. *American Journal of Botany*, **103**, 845–855. doi:10.3732/ajb.1500505

- Werneck, F. D. P., Giugliano, L. G., Rosane G., Collevatti, R. G. & Colli, G. R. (2009) Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). *Molecular Ecology*, **18**, 262–278. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03999.x
- Whitney, K. D., Ahern, J. R., Campbell, L. G., Albert, L. P. & King, M. S. (2010) Patterns of hybridization in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **12**, 175–182. doi:10.1016/j.ppees.2010.02.002
- Yatskievych, G. & Moran, R. C. (1989) Primary divergence and species concepts in ferns. *American Fern Journal*, **79**, 36–45. doi:10.2307/1547158
- Yuri, T., Kimball, R. T., Harshman, J., Bowie, R. C. K., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Han, K.-L., Hackett, S. J., Huddleston, C. J., Moore, W. S., Reddy, S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, C. C. & Braun, E. L. (2013) Parsimony and model-based analyses of indels in avian nuclear genes reveal congruent and incongruent phylogenetic signals. *Biology*, **2**, 419–444. doi:10.3390/biology2010419
- Zuquim, G., Tuomisto, H., Costa, F. R. C., Prado, J., Magnusson, W. E., Pimentel, T., Braga-Neto, R. & Figueiredo, F. O. G. (2012) Broad scale distribution of ferns and lycophytes along environmental gradients in central and northern Amazonia, Brazil. *Biotropica*, **44**, 752–762. doi:10.1111/j.1744-7429.2012.00880.x
- Zuquim, G., Tuomisto, H., Jones, M. M., Prado, J., Figueiredo, F. O. G., Moulatlet, G. M., Costa, F. R. C., Quesada, C. A. & Emilio, T. (2014) Predicting environmental gradients with fern species composition in Brazilian Amazonia. *Journal of Vegetation Science*, **25**, 1195–1207. doi:10.1111/jvs.12174

Liitteet

Liite 1. *petA* – *psbL* -alueen Jmodeltest-arvot

| Model | -lnL | K | AIC | delta | weight | cumWeight |
|--------------|-------------|----------|------------|--------------|---------------|------------------|
| GTR+G | 2879,977 | 125 | 6009,953 | 0 | 0,564 | 0,564 |
| GTR+I+G | 2879,406 | 126 | 6010,811 | 0,858 | 0,3672 | 0,9312 |
| GTR+I | 2882,457 | 125 | 6014,914 | 4,9603 | 0,0472 | 0,9784 |
| HKY+G | 2887,772 | 121 | 6017,543 | 7,5897 | 0,0127 | 0,9911 |
| HKY+I+G | 2887,265 | 122 | 6018,531 | 8,5774 | 0,0077 | 0,9988 |
| HKY+I | 2890,147 | 121 | 6022,294 | 12,3404 | 0,0012 | 1 |
| GTR | 2905,96 | 124 | 6059,92 | 49,9661 | 0 | 1 |
| HKY | 2911,994 | 120 | 6063,988 | 54,0351 | 0 | 1 |
| F81+G | 2928,111 | 120 | 6096,221 | 86,268 | 0 | 1 |
| F81+I+G | 2928,405 | 121 | 6098,811 | 88,8573 | 0 | 1 |
| F81+I | 2931,105 | 120 | 6102,21 | 92,2565 | 0 | 1 |
| F81 | 2953,917 | 119 | 6145,834 | 135,8811 | 0 | 1 |
| SYM+G | 2976,756 | 122 | 6197,512 | 187,5588 | 0 | 1 |
| SYM+I+G | 2976,699 | 123 | 6199,398 | 189,4446 | 0 | 1 |
| SYM+I | 2978,777 | 122 | 6201,553 | 191,6 | 0 | 1 |
| K80+G | 2985,113 | 118 | 6206,226 | 196,2728 | 0 | 1 |
| K80+I+G | 2984,284 | 119 | 6206,569 | 196,6154 | 0 | 1 |
| K80+I | 2986,505 | 118 | 6209,01 | 199,0563 | 0 | 1 |
| SYM | 3006,548 | 121 | 6255,096 | 245,1422 | 0 | 1 |
| K80 | 3011,994 | 117 | 6257,987 | 248,034 | 0 | 1 |
| JC+G | 3015,148 | 117 | 6264,296 | 254,3422 | 0 | 1 |
| JC+I+G | 3015,583 | 118 | 6267,166 | 257,2124 | 0 | 1 |
| JC+I | 3022,359 | 117 | 6278,718 | 268,7641 | 0 | 1 |
| JC | 3041,872 | 116 | 6315,745 | 305,7914 | 0 | 1 |

Liite 2. *psbA* – *matK* -alueen Jmodeltest-arvot

| Model | -lnL | K | AIC | delta | weight | cumWeight |
|--------------|-------------|----------|------------|--------------|---------------|------------------|
| GTR+G | 2263,601 | 129 | 4785,201 | 0 | 0,7566 | 0,7566 |
| GTR+I | 2265,421 | 129 | 4788,843 | 3,6414 | 0,1225 | 0,8791 |
| GTR+I+G | 2264,483 | 130 | 4788,966 | 3,7648 | 0,1152 | 0,9943 |
| GTR | 2269,598 | 128 | 4795,195 | 9,9939 | 0,0051 | 0,9994 |
| HKY+G | 2275,226 | 125 | 4800,452 | 15,2507 | 0,0004 | 0,9998 |
| HKY+I+G | 2275,329 | 126 | 4802,657 | 17,456 | 0,0001 | 0,9999 |
| HKY+I | 2276,561 | 125 | 4803,122 | 17,9209 | 0,0001 | 1 |
| HKY | 2279,639 | 124 | 4807,278 | 22,0764 | 0 | 1 |
| F81+G | 2318,529 | 124 | 4885,057 | 99,856 | 0 | 1 |
| F81+I | 2319,672 | 124 | 4887,344 | 102,1427 | 0 | 1 |
| F81+I+G | 2319,343 | 125 | 4888,686 | 103,4843 | 0 | 1 |
| F81 | 2322,659 | 123 | 4891,317 | 106,1162 | 0 | 1 |
| K80+G | 2353,513 | 122 | 4951,026 | 165,8247 | 0 | 1 |
| SYM+G | 2349,902 | 126 | 4951,804 | 166,6026 | 0 | 1 |
| K80+I+G | 2353,569 | 123 | 4953,137 | 167,9357 | 0 | 1 |
| K80+I | 2354,724 | 122 | 4953,448 | 168,2464 | 0 | 1 |
| SYM+I+G | 2350,059 | 127 | 4954,118 | 168,9164 | 0 | 1 |
| SYM+I | 2351,291 | 126 | 4954,582 | 169,3809 | 0 | 1 |
| K80 | 2358,429 | 121 | 4958,859 | 173,6576 | 0 | 1 |
| SYM | 2354,853 | 125 | 4959,706 | 174,505 | 0 | 1 |
| JC+G | 2389,179 | 121 | 5020,358 | 235,1571 | 0 | 1 |
| JC+I | 2390,337 | 121 | 5022,674 | 237,4728 | 0 | 1 |
| JC | 2393,135 | 120 | 5026,27 | 241,0688 | 0 | 1 |
| JC+I+G | 2399,777 | 122 | 5043,554 | 258,3527 | 0 | 1 |

Liite 3. *trnS-GGA* – *psbC* -alueen Jmodeltest-arvot

| Model | -lnL | K | AIC | delta | weight | cumWeight |
|--------------|-------------|----------|------------|--------------|---------------|------------------|
| GTR+I+G | 3360,533 | 112 | 6945,066 | 0 | 0,8866 | 0,8866 |
| GTR+G | 3363,589 | 111 | 6949,179 | 4,113 | 0,1134 | 1 |
| GTR+I | 3373,44 | 111 | 6968,879 | 23,8132 | 0 | 1 |
| HKY+G | 3377,6 | 107 | 6969,199 | 24,1334 | 0 | 1 |
| HKY+I+G | 3379,428 | 108 | 6974,855 | 29,7892 | 0 | 1 |
| HKY+I | 3388,449 | 107 | 6990,898 | 45,8316 | 0 | 1 |
| F81+I+G | 3406,896 | 107 | 7027,793 | 82,727 | 0 | 1 |
| F81+G | 3411,663 | 106 | 7035,326 | 90,2596 | 0 | 1 |
| GTR | 3408,826 | 110 | 7037,653 | 92,5867 | 0 | 1 |
| F81+I | 3418,009 | 106 | 7048,018 | 102,952 | 0 | 1 |
| HKY | 3421,08 | 106 | 7054,16 | 109,0936 | 0 | 1 |
| SYM+G | 3426,894 | 108 | 7069,788 | 124,7224 | 0 | 1 |
| K80+G | 3433,663 | 104 | 7075,327 | 130,2608 | 0 | 1 |
| K80+I+G | 3433,288 | 105 | 7076,575 | 131,5092 | 0 | 1 |
| SYM+I+G | 3429,857 | 109 | 7077,714 | 132,648 | 0 | 1 |
| SYM+I | 3441,852 | 108 | 7099,703 | 154,6375 | 0 | 1 |
| K80+I | 3449,377 | 104 | 7106,755 | 161,6887 | 0 | 1 |
| F81 | 3451,327 | 105 | 7112,654 | 167,5878 | 0 | 1 |
| JC+I+G | 3460,375 | 104 | 7128,75 | 183,6841 | 0 | 1 |
| JC+G | 3466,635 | 103 | 7139,269 | 194,2034 | 0 | 1 |
| JC+I | 3477,172 | 103 | 7160,345 | 215,2789 | 0 | 1 |
| SYM | 3474,028 | 107 | 7162,056 | 216,9896 | 0 | 1 |
| K80 | 3479,303 | 103 | 7164,605 | 219,5395 | 0 | 1 |
| JC | 3504,584 | 102 | 7213,167 | 268,1014 | 0 | 1 |