



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Hyaloscypha spiralis -kotelosienen näköislaji männyllä

Vanja Rimpiläinen

Biologia
LuK-tutkielma
Laajuus: 6 op

26.4.2024
Turku

*Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

LuK-tutkielma

Pääaine: Biologia

Tekijä: Vanja Rimpiläinen

Otsikko: *Hyaloscypha spiralis* -kotelosienen näköislaji männyllä

Ohjaajat: Timo Kosonen, Seppo Huhtinen

Sivumäärä: 11 sivua + liitteet 2 sivua

Päivämäärä: 26.4.2024

Ascomycota- eli kotelosientien kaareen kuuluu suurin osa tieteelle kuvatuista sienilajeista, mutta niiden tuntemus on vähäistä. Erityisesti kaaren suurimman alakaaren (*Pezizomycotina*) suurimpaan ja monimuotoisimpaan lahkoon (*Helotiales*) kuuluvista lajeista tiedetään todella vähän. Lahko on monimuotoinen, sisältäen niin saprotrofeja, mykorritsoja, kuin loisiviakin lajeja. Sen lajeja on tavattu maailmanlaajuisesti, kuitenkin diversiteettikeskittymä osuu boraaliselle ja temperaattiselle vyöhykkeelle. Näin monimuotoisen ryhmän parempi tuntemus tarjoaisi paremman pohjan paitsi tarkemmalle taksonomiselle tutkimukselle, niin myös paremmalle ekologiselle ymmärrykselle. Tutkimuksessani tarkastelen aiemmassa tutkimuksessa havaittua mahdollisesti tieteelle uutta lajia tästä lahkosta. Kyseinen mahdollisesti uusi laji muistuttaa ulkoisesti lajia *Hyaloscypha spiralis*. Tämän näköislajin näytteet löydettiin metsämännyltä (*Pinus sylvestris*), joten sen työnimeksi annettiin ”*Hyaloscypha pini*” nom. prov. Tutkimuskysymykseni oli eroavatko männyltä löytyneet näköislajipopulaatiot *H. spiralis* -lajista geneettisesti siten, että niiden voidaan katsoa edustavan tieteelle aiemmin tuntematonta lajia. Vertailtuani sen DNA-viivakoodia muihin *Hyaloscypha*-suvun lajeihin ja lähisukulaisiin, havaitsin sen eroavan niistä merkitsevästi. Lajin formaalia kuvausta tieteelle ei kuitenkaan tehdä vielä tämän tutkielman yhteydessä, sillä se tulee tehdä virallisessa tieteellisessä julkaisussa, jotta tieto lajista tavoittaa muun tiedeyhteisön. Tutkimukseni kuitenkin toi lisätietoa eliöryhmän taksonomiasta, ja vahvisti käsitystä, että lisää tutkimusta aiheesta tarvitaan. Esimerkiksi *H. albohyalina* ja *H. spiralis* -näytteiden osalta tulokset eivät vielä tällä aineistolla olleet yksiselitteisiä. Suvun lajeista on geeniaineistoa saatavilla toistaiseksi niukasti, joten uusia näytteitä kaivataan. Niiden keräämisen myötä toivottavasti myös ekologinen ymmärrys *Hyaloscypha*-suvun lajeista kasvaisi.

Avainsanat: *Helotiales*, *Hyaloscypha spiralis*, lajituntemus, taksonomia, näköislaji, kuvaamaton laji

Sisällys

1	Johdanto.....	1
1.1	Taustaa	1
1.2	Kotelosienten morfologia	1
1.3	Tutkimuskysymys ja hypoteesi	2
2	Menetelmät	4
2.1	Aineiston keruu ja tunnistus	4
2.2	Fylogeneettinen analyysi	5
3	Tulokset.....	7
4	Pohdinta	9
	Kiitokset	11
	Lähteet.....	12
	Liite.....	13

1 Johdanto

1.1 Taustaa

Kotelosienet eli *Ascomycota* on sienikaari, johon kuuluu noin 64 % toistaiseksi kuvatuista sienilajeista (Timonen & Valkonen 2018). Tunnuspiirteenä kaaren lajeille on itiökotelo, eli askus, joka on kaksiseinäinen itiöitä kypsyttävä säkkimäinen rakenne. Kaareen kuuluu kolme alakaarta: *Taphrinomycotina*, *Saccharomycotina*, ja lajimäärältään suurin *Pezizomycotina*.

Helotiales-lahko on *Pezizomycotina*-alakaareen kuuluvista lahkoista suurin. Se on huonosti tunnettu ja erittäin monimuotoinen ryhmä. Arviot *Helotiales*-lahkon tieteelle kuvattujen lajien määrästä vaihtelee välillä 2360–3881 (Kirk ym. 2008; Baral 2016), kun *Helotiales*-lahkon maailmanlaajuisesti kokonaislajimääräksi on arvioitu 70 000 (Hawksworth 2001). Lahkoon kuuluu sekä loisivia, saprotrofisia eli kuollutta ainesta ravinnokseen käyttäviä, että mykorritsaa eli sienijuurta muodostavia sienilajeja. Lahkoon kuuluvia lajeja esiintyy maailmanlaajuisesti, mutta *Helotiales*-lahkon, kuten koko sen ylemmän taksonin *Leotiomycetes*-luokan lajiversiteetin on havaittu olevan korkeimmillaan boreaalaisella ja temperaalaisella vyöhykkeellä (Tedersoo ym. 2014). Lahkon suuren diversiteetin myötä myös Suomen luonnosta on kaikkialta läpi kasvukauden löydetty siihen kuuluvia lajeja (Timonen & Valkonen 2018).

Koska mahdollisimman laaja biodiversiteetin tuntemus ja ymmärrys on tarpeellista ympäristön tilan seuraamisen ja lajiversiteetin suojelun näkökulmasta, taksonomista tutkimusta on kohdistettava etenkin näin tuntemattomaan eliöryhmään. Esimerkiksi ympäristömuutosten vaikutusten arviointi on huonosti tunnetun lajiryhmän osalta käytännössä lähes mahdotonta. Metsäekosysteemissä jokainen yksittäinen eliö on vuorovaikutuksessa ympärillään olevien muiden eliöiden kanssa, eikä voida ennustaa, minkälainen tapahtumaketju jonkin kooltaan pienenkin lajin mahdollisesta sukupuutosta seuraa koko ekosysteemiin. Etenkään silloin, jos lajista ei vielä tiedetä mitään.

1.2 Kotelosienten morfologia

Vuonna 1992 Hans-Otto Baral osoitti, että kotelosienten taksonomisessa tutkimuksessa on tuotava ilmi, tarkastellaanko mikromorfologisia lajituntomerkkejä tuoretta vai kuivattua herbaarionäytettä käyttäen. Sienisolujen rakenne voi kuivuessa muuttua huomattavasti ja koko pienentyä jopa 30–50 %, jolloin jotkin lajituntomerkit saattavat kadota. Koska kotelosienten morfologinen lajintunnistus perustuu näiden itiöiden mikromorfologisten ominaisuuksien mittaukseen, kuivumisen aikana tapahtuvia rakenteellisia

muutoksia ei voida sivuuttaa, eivätkä eri ikäiset näytteet ole vertailukelpoisia. Baral kehitti menetelmän tuoreiden näytteiden huolellista tutkimista varten ja käytti siitä termiä vitaalitaksonomia.

Kotelosienten morfologian tarkastelussa tulee hyödyntää myös kemiallisia tuntomerkkejä ja verrata eri reagenssien vaikutuksia näytteisiin. Vasteina voidaan havaita värimuutoksia, solurakenteiden pinnalla olevan hartsin liukenemistä sekä osmoottisen paineen aiheuttamaa turpoamista tai supistumista soluissa. Vasteet ovat usein lajikohtaisia, joten jokainen havaittu muutos tulee kirjata. Näytteen tuoreus on huomioitava myös tutkittaessa reagenssien vaikutuksia, koska vaste saattaa olla hyvin erilainen tuoreessa ja kuivatussa näytteessä, eivätkä monet rakenteet palaudu kuivuttuaan ennalleen edes uudelleen kastelemalla.

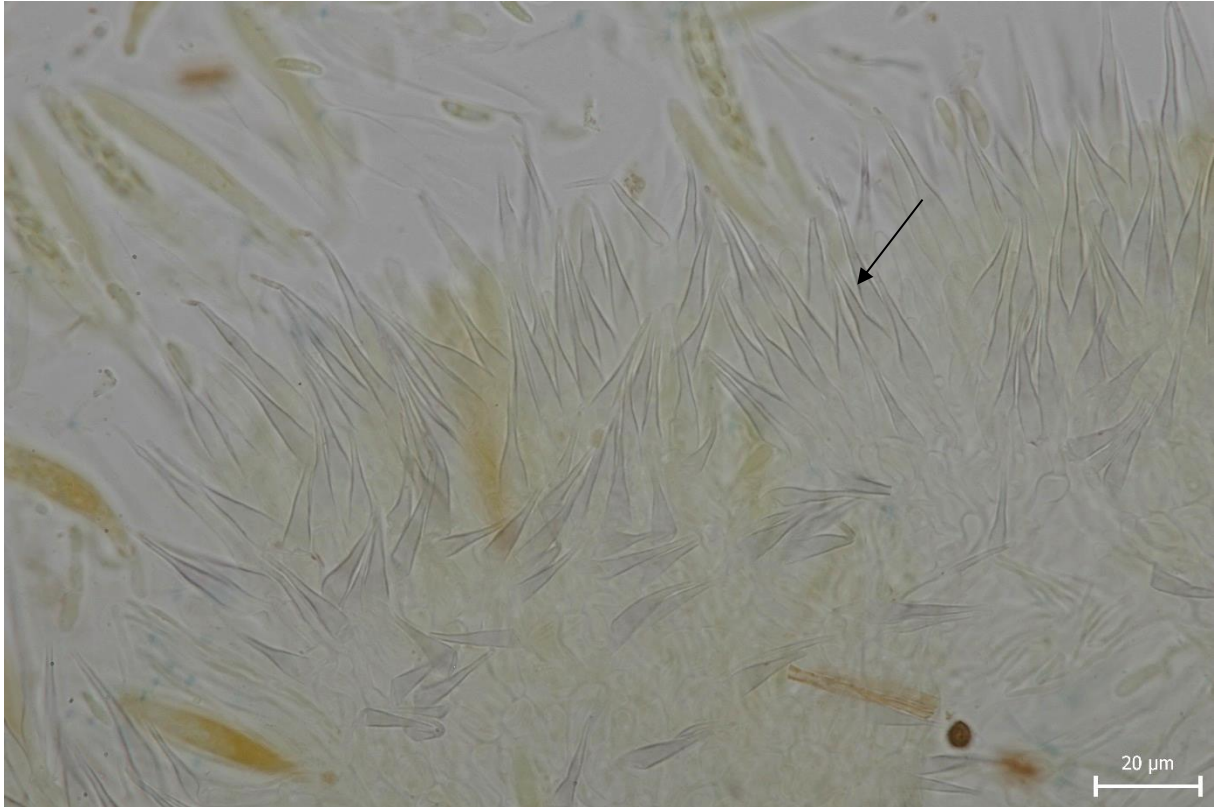
1.3 Tutkimuskysymys ja hypoteesi

Tutkimushankkeessa ”Lahopuulla elävien *Helotiales*-lahkon kotelosienten taksonomia, esiintyminen ja elinympäristövaatimukset” (Huhtinen ym. 2023) vuoden 2022 aikana tehdyissä maastotöissä lahopuun lajistokartoitusten yhteydessä kertyi runsaasti kotelosieninäytteitä. Näytteet tunnistettiin ja nimettiin. Yksi kerätyistä lajeista oli melko yleisesti havaittu, laholla havu- tai lehtipuulla kasvava *Hyaloscypha spiralis* (Velen) J.G. Han, Hosoya, H.D. Shin. Sen itiöemä on yleensä alle 0,5 mm kokoinen, kuuluu valkea, hieman kellertävä hyytelömäinen malja, jonka reunoilla on lyhyitä karvoja (Huhtinen 1989). Osassa *H. spiralis* -näytteistä havaittiin lajille poikkeuksellista sinistä värjäytymistä karvojen kärjissä Melzerin reagenssissa (MLZ), eli ne olivat amyloideja (kuva 1).

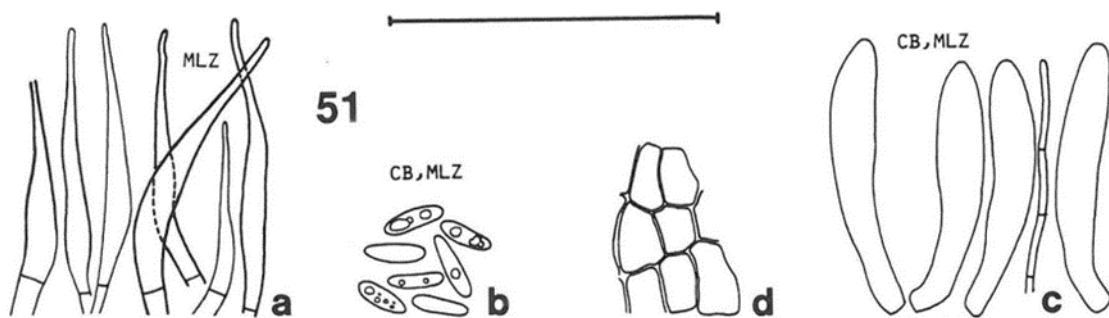
Huhtinen kuvasi monografiassaan (1989) *H. spiralis* -lajilla laajalti sisäistä vaihtelua, mutta toi jo tuolloin ilmi laajemman tutkimuksen tarpeen. Reaktiivisuuserojen havaitsemisen jälkeen lajin morfologisia ominaisuuksia tarkasteltiin lisää, ja muitakin mahdollisia ulkoisia lajituntomerkkejä havaittiin, kuten karvojen sileä pinta ja paksummat seinämät. Huhtisen monografiaansa piirtämistä *H. spiralis* -lajin näytteistä tunnistettiin myös todennäköisesti saman lajin yksilö (kuva 2). Kaikki amyloidit *H. spiralis* -näköislajin näytteet olivat löytyneet metsämännyltä (*Pinus sylvestris* L.), joten niille annettiin työnimeksi ”*Hyaloscypha pini*” (nom. prov.).

Tutkimusryhmällä oli siis hallussaan näytteitä mahdollisesti tieteelle tuntemattomasta lajista. Hypoteesiksi muodostui, että ”*H. pini*” olisi tieteelle aiemmin kuvaamaton laji, mutta sen todistaminen vaati kuitenkin lisää tutkimusta. Taksonomiseen tutkimukseen kuuluu myös genomien luenta kokonaan tai osittain, esimerkiksi DNA-viivakoodeja käyttäen. Tutkielmani tutkimuskysymykseksi muodostui

seuraava: eroavatko männyltä löytyneet näköislajipopulaatiot *Hyaloscypha spiralis* -lajista geneettisesti siten, että niiden voidaan katsoa edustavan tieteelle aiemmin tuntematonta lajia? Tutkin kysymystä fylogeneettisen analyysin avulla.



Kuva 1: ”*Hyaloscypha pini*” nom. prov. -murskepreparaatti (squash mount). Nuoli osoittaa yhtä itiöemän karvaa, jossa amyloidi reaktio MLZ-reagenssiin erottuu. Kuva: Timo Kosonen



Kuva 2: Seppo Huhtisen piirtämä *Hyaloscypha albohyalina* var. *spiralis* -näyte (Huhtinen 1989, Karstenia 29: sivu 101 kuva 51), joka myöhemmin on tunnistettu morfologian perusteella olevan ”*Hyaloscypha pini*” nom. prov. Kuvassa merkittynä rakenteet: a) karvat b) itiöt c) askukset d) malto. Mittakaava on 50 μm.

2 Menetelmät

2.1 Aineiston keruu ja tunnistus

Vuonna 2022 Huhtinen ja työryhmä (2023) keräsi näytteitä neljässä eri tutkimuskohteessa (Kotisten aarnialue, Patvinsuon kansallispuisto, Pisavaaran ja Ulvinsalon luonnonpuistot) yhteensä 96 lahoppurungolta. Lahoppulajeja oli metsähaapa (*Populus tremula* L.), koivu (*Betula* sp. L.), metsäkuusi (*Picea abies* (L.) H. Karst.) ja metsämänty. Rungot sijaitsivat puolet kangasmetsässä ja puolet lehtomaisissa metsissä. Ne valittiin siten, että niiden halkaisija ylitti 15 cm ja niiden lahoaste oli välillä 2–4, kun lahoasteessa 2 runko on vielä melko kova (puukko painuu runkoon n. 1–2 cm) ja lahoasteessa 4 runko on jo selkeästi lahonnut ja pehmeä (puukko uppoaa runkoon helposti) (Renvall 1995). Rungot tutkittiin sekä kasvukauden alussa, että lopussa. Kotelosienesiintymistä kirjattiin sijainti rungolla, kasvukohdan lahoaste, etäisyys maahan, sekä kaarna- ja sammalpeitteisyys. Esiintymäkohdista kerättiin näytepala rungosta määrittystä varten.

Työryhmä suoritti lajinmäärityksen seuraavasti: Mikroskoopilla etsittiin maastonäytepalasta itiöemä, joka sitten poimittiin preparointineulaa käyttäen aluslasille vesipisaraan. Itiöemänäytteen päälle asetettiin peitinlasi ja ylimääräinen vesi imeytettiin näytteestä. Peitinlasi paineltiin aluslasiin, jotta itiöemä murskaantui ja sen rakenteet hieman erkanivat toisistaan ja olivat selkeämmin havaittavissa. Näin näytteestä saatiin murskepreparaatti (squash mount). Murskepreparaattista tunnistettiin ja mitattiin herbaariomateriaaliin verraten vitaalitaksonomian tuntomerkit. Seuraavaksi se altistettiin vuoroin eri reagenssiliuoksille, jotka on eritelty taulukossa 1. Liuokset noudattivat Huhtisen reseptiä (Huhtinen 1989)

Taulukko 1: Näytteiden mikroskooppitarkastelussa käytetyt liuokset ja niiden käyttöperusteet.

Liuos	Käyttöperuste
Lugolin liuos (LUG; jodi-kaliumjodidi)	Sen avulla havaitaan esimerkiksi hemiamyloidisuus
Melzerin reagenssi (MLZ; $C_2H_3Cl_3O_2$)	Se osoittaa näytteen amyloidisuuden/dekstrinoidisuuden, ja aiheuttaa esimerkiksi värimuutoksia, hartsien liukenemista ja solujen supistumista
Cotton Blue (CB)	Väriaine
Congo Red (CR)	Väriaine

Osasta näytteistä tuotettiin kasvatus mallas-agar-maljoille. Onnistuneilta kasvustoilta eristettiin myöhemmin DNA:ta NucleoSpin Gel and PCR Clean-up -kittiä (Macherey–Nagel, Saksa) käyttäen. PCR-menetelmällä monistettiin sienten DNA-viivakoodina toimivat ITS (eli ITS1 ja ITS2, internal transcribed spacers) sekä LSU (28S large subunit geenistä nrRNA).

Aloittaessani tutkielmaani, edellä mainitut menetelmät olivat aineistoni osalta jo valmiit, mutta pääsin itse toistamaan menetelmiä toisen samankaltaisen 01.01.2023 alkaneen Jenna Purhosen johtaman DEADMON (A protocol for long term monitoring of saproxylic species) -tutkimushankkeen yhteydessä niin maastotöiden, kuin lajinmäärityksenkin osalta. Sain myös tilaisuuden DNA:n eristyksen ja PCR-menetelmän käytännön kertaukseen.

2.2 Fylogeneettinen analyysi

Hain geenipankista lisää ITS ja LSU alueet sisältäviä näytteitä *H. spiralis* -lajista ja sen tunnetuista sukulaislajeista (Kosonen ym. 2021) . Ulkoryhmäksi valittiin samasta heimosta *Hyaloscyphaceae* laji *Resinoscypha variepilosa* (R. Galán & Raitviir) T. Kosonen, Huhtinen & K. Hansen. Samasta heimosta valittiin myös *Eupezizella*-suvusta lajit *E. aureliella* (Nyl.) T. Kosonen, Huhtinen & K. Hansen ja *E. britannica* (Huhtinen) T. Kosonen, Huhtinen & K. Hansen.

Muut verrattavat lajit valittiin *Hyaloscypha*-suvusta sen perusteella, että niiden tiedettiin olevan selkeästi erilaisia morfologialtaan ja ekologialtaan suhteessa lajiin *H. spiralis*. Niitä oli: *H. albohyalina* (P. Karst.) Boud.; *H. herbarum* Velen., *H. hepaticicola* (Grelet & Croz.) Baral, Huhtinen & J.R. De Sloover; *H. intacta* Svrček; *H. monodictys* (Hosoya & Huhtinen) J.G. Han, Hosoya, H.D. Shin; ja *H. vitreola* (P. Karst.) Boud. Käytetty aineisto on koottu liitteeseen 1.

Yhdistin maastonäytteiden julkaisemattoman sekvenssiaineiston geenipankista saamaani aineistoon. Kohdistin koko aineiston aluksi karkeasti AliView-sovelluksella (Larsson 2014) ja sitten käsin konservatiivisten geenialueiden mukaan. Lopuksi rajasin aineiston päädyistä pois ne alueet, joissa sekvenssitietoa oli vain harvassa näytteessä. Geeniaineiston käsittelyyn on kehitetty useita erilaisia työkaluja tulkintaerojen minimoimiseksi, mutta aineistoni pienen koon vuoksi ulkoisen kohdistustyökalun käyttö ei ollut tarpeen.

Tein aineistolle Suurimman uskottavuuden uudelleenotanta -analyysin (ML) (eng. Maximum likelihood bootstrap) käyttämällä RaxML-HPC2-työkalua (Stamatakis 2014). ML-analyysi perustuu homologisten

geenialueiden vertailuun, ja tuottaa sukupuuna todennäköisimmän mahdollisen selityksen lajien sukulaisuuksille. Teetin aineistollani 1000 uudelleenotantaa. Uudelleenotannalla analyysi toistetaan pienillä variansseilla pyydetyn uudelleenotannan verran. Tuloksena saadaan tukiarvo prosentteina, ja se kertoo, kuinka monella iteraatiolla ML-analyysin tuottama tulos pysyi samana. Uudelleenotannan tukiarvo (ML-BP) on merkitsevä, kun $ML-BP \geq 75\%$. Jos tukiarvo on pienempi, on aineisto monitulkintainen, ja tällainen solmu (eng. node) edustaa vain yhtä monista mahdollisista tulkinnoista. Tällaisessa tilanteessa aineisto ei ole riittävän laaja, eikä voida tietää vastaako solmu lajien todellisia sukulaisuussuhteita.

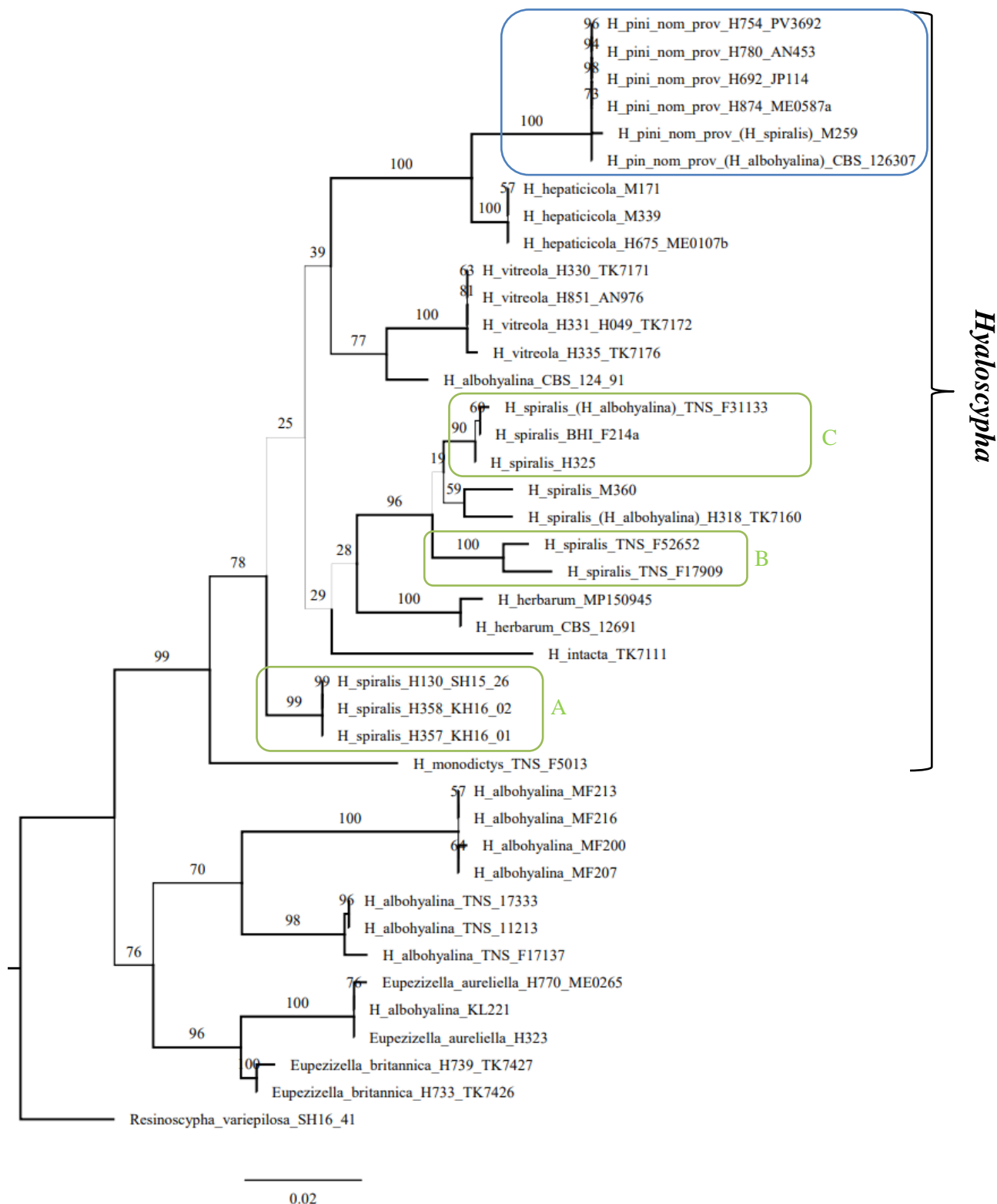
3 Tulokset

ML-BP-analyysiin perustuva sukupuu on esitetty kuvassa 3. Aineisto jakautuu kahteen kehityslinjaan: *Eupezizella*-kehityslinja (ML-BP=76 %), sekä *Hyaloscypha*- kehityslinja (ML-BP=99 %). *Eupezizella*-linja jakautuu kahteen linjaan, joista toisessa lajit *E. aureliella* ja *E. britannica* (ML-BP=96 %), ja toisessa on suurin osa *H. albohyalina* -näytteistä (ML-BP=70 %) kahdessa eri kehityslinjassa (ML-BP=100 % ja ML-BP=98 %). *Hyaloscypha* -kehityslinja jakautuu kymmeneen tuettuun kehityslinjaan.

Aineistoni ”*Hyaloscypha pini*” nom. prov. -näytteet muodostavat yhtenäisen kehityslinjan *Hyaloscypha*-kehityslinjan sisällä (ML-BP=100 %). Siihen kehityslinjaan sisältyvät myös näytteet *H. spiralis* (M259) ja *H. albohyalina* (CBS: 126307).

Hyaloscypha -kehityslinjan tyvellä (eng. basal lineage) on *H. monodictys*, ja sen sisarlinja (ML-BP=78 %). Sen kehityslinjan tyvellä on kolmen *H. spiralis* -näytteen linja (ML-BP=99 %) (kuvassa 3 kehityslinja A), mutta sen sisarlinja ei ole analyysin tukema (ML-BP=25 %). Tämän linjan tyvilinja on tukiarvolla ML-BP=29 %, ja siihen kuuluu *H. intacta* -näyte ja sen sisarlinja. Tämä sisarlinja (ML-BP=28 %) sisältää *H. herbarum* -lajin kehityslinjan (ML-BP=100 %), sekä suurimman osan *H. spiralis* -lajin näytteistä kahdessa eri kehityslinjassa, joista toisessa (kehityslinja B) ML-BP=100 %, ja toisessa ML-BP=19 %. Jälkimmäinen linja on vielä jakautunut kahteen kehityslinjaan arvoilla ML-BP=59 % ja ML-BP=90 % (kehityslinja C), ja kummassakin linjassa on yksi *H. albohyalina*.

Edellä eritellyn kehityslinjan sisarlinjan tukiarvo on ML-BP=39 %. ja se jakautuu kahteen kehityslinjaan. Toisessa (ML-BP=77 %) on *H. vitreola* -kehityslinja tukiarvolla ML-BP=100 %, sekä omassa linjassaan yksi *H. albohyalina* (CBS: 124.91) -näyte. Näiden muodostaman linjan sisarlinjassa (ML-BP=100 %) on *H. hepaticicola* -kehityslinja (ML-BP=100 %) ja aiemmin mainittu ”*H. pini*” nom. prov. -kehityslinja.



Kuva 3: Fylogeneettinen sukulaisuus lajien ”*Hyaloscypha pini*” nom. prov. (sinisellä rajattu kehityslinja) ja *Hyaloscypha spiralis* (vihreällä rajatut kehityslinjat A, B ja C) välillä ML-BP -analyysin mukaan käyttäen DNA-viivakodeja ITS+LSU. Solmun (eng. node) vahvuus ja uudelleenotannan tuki-arvo kuvaa tuloksen merkitsevyyttä kun ML-BP ≥ 75 % on merkitsevä

4 Pohdinta

Aineistoni ”*Hyaloscypha pini*” nom. prov. -näytteiden sekvenssit ovat identtiset, ja ne muodostavat oman kehityslinjansa *Hyaloscypha*-suvussa. Laji myös eroaa sukulaislajeistaan geneettisesti tarpeeksi, jotta sen voidaan todeta olevan tieteelle toistaiseksi kuvaamaton laji. Analyysissäni vertailu kohdistui useaan korkeita tuki-arvoja saaneeseen suvun lajiin, joten tuki hypoteesilleni on vahva. Tuloksista on havaittavissa myös, että ”*H. pini*” nom. prov. on läheisintä sukua vertailulajeista *H. hepaticicola* -lajille, eikä *H. spiralis* -näköislajilleen, kuten morfologian perusteella olisi voinut arvella.

H. spiralis -lajin morfologiaan perustuva lajikäsitys on todettu laajaksi (Huhtinen 1989), ja omassa tutkimuksessani lajin puutteellinen tuntemus on edelleen huomattavissa; kaikki sen nimiset näytteet eivät aineistossani edusta samaa lajia, vaan analyysini tuloksista ilmenee yhteensä kolme eri tuettua kehityslinjaa *H. spiralis* -näytteille (kuvassa 3 merkittynä kirjaimin A, B ja C). Esimerkiksi kolmen Ruotsista löydetyn näytteen kehityslinja A on puussa erillään lähes *Hyaloscypha*-suvun tyvellä, mistä huomataan, että ne eroavat geneettisesti huomattavasti muista *H. spiralis* -näytteistä. Kehityslinjat B ja C jakautuvat erilleen samasta analyysin tukemasta kehityslinjasta, joka sisältää suurimman osan *H. spiralis* -näytteistä. Tämän kehityslinjan sisäiset tuki-arvot ovat linjoja B ja C lukuun ottamatta matalia, mikä kertoo, että aineisto on monitulkintainen, eikä analyysi kykene sen perusteella luotettavasti tunnistamaan sukulaisuuksia. On kuitenkin selvää jo tämän fylogeneettisen puun myötä, että kehityslinjojen B ja C näytelajit ovat ainakin läheisempää sukua toisilleen suhteessa kehityslinjan A näytteisiin.

Tutkimukseni painottuu fylogeneettisen analyysin tuottamaan tietoon lajiutumisen, mutta lajikäsitystä tulisi tarkastella sen lisäksi myös muilla keinoin. Esimerkiksi *H. spiralis* -lajin osalta jo kerättyjen näytteiden tarkempi morfologinen tarkastelu saattaisi kertoa lisää siitä, mitä varsinaiseen lajin sisäiseen vaihteluun todellisuudessa sisältyy. Voihan olla, että esimerkiksi muista samannimisistä näytteistä erilleen asettuneen *H. spiralis* -kehityslinjan A näytteet edustaisivatkin morfologialtaan ennalta tunnettujen lajipiirteiden ääripäätä. Tällöin jo valmiiksi poikkeuksellisina pidettyjen piirteiden voitaisiin katsoa mahdollisesti olevan sittenkin tämän lajin lajituntomerkkejä. Pelkän tekemäni fylogeneettisen analyysin perusteella kehityslinjasta ei vielä voi tehdä kuin arvauksia, mutta edellä esitetyssä skenaariossa analyysin ja morfologisen tarkastelun summana olisi perusteltua kyseenalaistaa näytteiden olevan sittenkään *H. spiralis* -lajia. Näytteiden kasvuympäristöjä vertailemalla voisi myös mahdollisesti tehdä päätelmiä lajiutumisen, mutta kaikkien näytteiden osalta ekologiatietoja ei ollut saatavilla. Lajin tarkemman taksonomian selvittäminen vaatisi uusien näytteiden keräämistä aineiston kasvattamiseksi, ja uusien näytteiden ekologiatietoja olisi suotavaa kirjata nykyistä laajemmin muun tiedeyhteisön saataville. On mahdotonta vertailla eri lajien kasvuolosuhteita, mikäli tietoa ei ole jaettu. Ilman

lisänäytteitä ei voida myöskään hahmottaa mikä on näytteiden alkuperämaiden yhteys saamiini tuloksiin.

H. spiralis -lajin lisäksi myös *H. albohyalina* -lajin osalta tulokset eivät olleet yksiselitteiset. Kuten aiemmin toin ilmi, kaikki *H. albohyalina* -näytteet eivät analyysini mukaan kuulu *Hyaloscypha*-sukuun. Tulokseni eivät tältä osin ole uusia, vaan samanlaisia tuloksia on osoittanut Han ym. (2014), Fehrer ym. (2019) ja Kosonen ym. (2021). Lajille on osoitettu laajaa vaihtelua myös morfologian osalta jo ennen geenitutkimuksen yleistymistä (Huhtinen 1989). Hämmennystä luo myös esimerkiksi geenipankin käytäntö: vaikka sekvenssin (näytteen) nimen olisi osoitettu olevan väärä ja pätevämpi olisi tarjolla, voi nimen päivittää tietokantaan vain aineiston alun perin jakanut taho. Esimerkiksi useat käyttämästäni *H. spiralis* -näytteistä oli geenipankissa edelleen nimellä *Hyaloscypha albohyalina* var. *spiralis*, vaikka nykyään *H. spiralis* ei kuulu *H. albohyalina* -lajin variaatioihin.

Vaikka fylogeneettinen analyysi tukee hypoteesiani, ”*H. pini*” nom. prov. -lajin formaali kuvaaminen tieteelle vaatii kuitenkin vielä työtä. Lajista tulee esitellä tyyppinäyte, eli holotyyppi, joka tulee sijoittaa julkiseen kokoelmaan, kuten yliopiston museoon. Oleelliset morfologiset lajituntomerkit tulee eritellä viitaten holotyyppiin, ja lajin nimiehdotus tulee hyväksyttävä sientaksonomiaa taltioivalla tietokannalla (Mycobank). Lajin kuvaaminen ei pelkän työmääränsä vuoksi mahtuisi tämän tutkielman puitteisiin. Oleellisinta on kuitenkin se, että tieteelle uuden lajin kuvaamisen tulee tapahtua virallisessa tieteellisessä julkaisussa, jotta päivitetty taksonomia on myös muun tiedeyhteisön saatavilla selkeänä ja yksiselitteisenä.

Kiitokset

Suuret kiitokset tutkimusaiheen tarjoamisesta, asiantuntijuudesta ja kärsivällisyydestä ohjaajilleni Seppo Huhtiselle sekä Timo Kososelle. Kiitokset myös opiskelutovereilleni vertaistuesta, kannustuksesta, ja siitä että olette aina valmiina auttamaan kysymyksestä ja sen aiheesta riippumatta.

Lähteet

- Baral H-O (1992) Vital versus herbarium taxonomy: morphological differences between living and dead cells of *Ascomycetes*, and their taxonomic implications
- Baral H-O. (2016), Leotiomycetes. Teoksessa: Jaklitsch W, Baral H-O, Lücking R, ym. (eds), Syllabus of plant families – A. Engler’s Syllabus der Pflanzenfamilien Part 1/2: s. 157–205 13. painos, Borntraeger Science Publishers, Saksa
- Fehrer J, Réblová M, Bambasová V, Vohník M (2019) The root-symbiotic *Rhizoscyphus ericae* aggregate and *Hyaloscypha* (*Leotiomycetes*) are congeneric: Phylogenetic and experimental evidence. *Stud Mycol* 92:195–225
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.10.004>
- Han JG, Hosoya T, Sung GH, Shin HD (2014) Phylogenetic reassessment of *Hyaloscyphaceae* sensu lato (*Helotiales*, *Leotiomycetes*) based on multigene analyses. *Fungal Biol* 118:150–167
<https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2013.11.004>
- Hawksworth DL (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105:1422–1432
<https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Huhtinen S (1989) A monograph of *Hyaloscypha* and allied genera. *Karstenia* 29:45–252
- Huhtinen S, Purhonen J, Kosonen T (2023) Loppuraportti: Lahopuulla elävien *Helotiales*-lahkon kotelosienten taksonomia, esiintyminen ja elinympäristövaatimukset
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Staplers JA ym. (2008), Ainsworth and Bisby’s dictionary of the fungi, s. 310, 10. painos, CAB International, Englanti
- Kosonen T, Huhtinen S, Hansen K (2021) Taxonomy and systematics of *Hyaloscyphaceae* and *Arachnopezizaceae*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 46:26–62
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.02>
- Renvall P (1995) Community structure and dynamics of wood-rotting *Basidiomycetes* on decomposing conifer trunks in northern Finland. *Karstenia* 35:1–51
<https://doi.org/10.29203/ka.1995.309>
- Stamatakis A (2014) RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 10.1093/bioinformatics/btu033
<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033.abstract>
- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S ym. (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* (1979) 346: 6213
<https://doi.org/10.1126/science.1256688>
- Timonen S, Valkonen J (2018), *Sienten biologia*, 27–39 2. painos, Gaudeamus Oy

Liite

Liite 1: Kooste fylogeneettisessä analyysissä käytetystä aineistosta ja näytteiden tunnuksista. Näytteitä oli yhteensä n=41. Puuttuvat tiedot on merkitty viivalla (–), ja julkaisemattomat lyhenteellä (unpub.).

Laji	Näytenumero	Ekologia	Keräyspaikka / maa	Vuosi	Kerääjä	ITS	LSU
<i>Eupezizella aureliella</i>	H770 ME0265	mänty (<i>Pinus sylvestris</i>)	Pisavaara / Suomi	2021	Maria Erälinna	unpub.	unpub.
<i>E. aureliella</i>	H323	–	Suomi	–	Otto Miettinen	MT231687.1	MT231687.1
<i>E. britannica</i>	H733 TK7426	haapa (<i>Populus tremula</i>)	Pisavaara / Suomi	2021	Timo Kosonen	unpub.	unpub.
<i>E. britannica</i>	H739 TK7427	mänty (<i>Pinus sylvestris</i>)	Pisavaara / Suomi	2021	Timo Kosonen	unpub.	unpub.
<i>Hyaloscypha albohyalina</i>	CBS: 124.91	–	Norja	1988	–	–	MH878556.1
<i>H. albohyalina</i>	KL221	kanarianmänty (<i>Pinus canariensis</i>)	Espanja	–	–	–	KX090818_1
<i>H. albohyalina</i>	TNS: F17333	–	Japani	2004	–	AB546939.1	AB546938.1
<i>H. albohyalina</i>	TNS: F11213	–	Japani	2002	–	JN033437.1	JN086882.1
<i>H. albohyalina</i>	TNS: F17137	–	Japani	2004	–	JN033431.1	JN086734.1
<i>H. albohyalina</i>	MF213	–	Morassina / Saksa	–	Marie Harpke	MH487554.1	–
<i>H. albohyalina</i>	MF216	–	Morassina / Saksa	–	Marie Harpke	MH487555.1	–
<i>H. albohyalina</i>	MF200	–	Morassina / Saksa	–	Marie Harpke	MH487632.1	–
<i>H. albohyalina</i>	MF207	–	Morassina / Saksa	–	Marie Harpke	MH487549.1	–
<i>H. hepaticicola</i>	M171	–	Suomi	–	Ari-Pekka Nieminen	EU940194.1	EU940118.1
<i>H. hepaticicola</i>	M339	–	Suomi	–	Mikael Kukkonen	EU940226.1	EU940150.1
<i>H. hepaticicola</i>	H675 ME0107b	metsäkuusi (<i>Picea abies</i>)	Ulvinsalo / Suomi	2021	Maria Erälinna	unpub.	unpub.
<i>H. herbarum</i>	MP150945	–	Suomi	2015	M. Pennanen	MT231693.1	MT231693.1
<i>H. herbarum</i>	CBS: 126.91	–	–	–	–	MH018931.1	OP340030.1
<i>H. intacta</i>	TK7111	–	Viro	2015	Timo Kosonen	MT231694.1	MT231694.1
<i>H. monodictys</i>	TNS: F5013	–	Japani	–	–	JN033456.1	JN086756.1
” <i>H. pini</i> ” nom. prov.	H874 ME0587a	mänty (<i>Pinus sylvestris</i>)	Häme / Suomi	2021	Maria Erälinna	unpub.	unpub.
” <i>H. pini</i> ” nom. prov.	H754 PV3692	mänty (<i>Pinus sylvestris</i>)	Pisavaara / Suomi	2021	Pyry Veteli	unpub.	unpub.
” <i>H. pini</i> ” nom. prov.	H692 JP114	mänty (<i>Pinus sylvestris</i>)	Ulvinsalo / Suomi	2021	Jenna Purhonen	unpub.	unpub.
” <i>H. pini</i> ” nom. prov.	H780 AN453	mänty (<i>Pinus sylvestris</i>)	Pisavaara / Suomi	2021	Aleksi Nirhamo	unpub.	unpub.
” <i>H. pini</i> ” nom. prov. as <i>H. albohyalina</i>	CBS: 126307	–	Suomi	–	–	MH863972.1	–
” <i>H. pini</i> ” nom. prov. as <i>H. spiralis</i>	M259	–	Suomi	–	Ari-Pekka Nieminen	EU940227.1	EU940151.1

Liite 1: jatkuu.

Laji	Näyttenumero	Ekologia	Keräyspaikka / maa	Vuosi	Kerääjä	ITS	LSU
<i>H. spiralis</i> as <i>H. albohyalina</i>	H318 TK7160	leppä (<i>Alnus</i>)	Ruotsi	2016	Timo Kosonen	unpub.	unpub.
<i>H. spiralis</i> as <i>H. albohyalina</i>	TNS: F31133	–	Japani	2007	Tsuyoshi Hosoya	AB546941.1	LC424953.1
<i>H. spiralis</i>	H130 SH15 / 26	–	Härjedalen / Ruotsi	2015	Seppo Huhtinen	unpub.	unpub.
<i>H. spiralis</i>	H358 KH16.02	–	Dalsland / Ruotsi	2016	Karen Hansen	unpub.	unpub.
<i>H. spiralis</i>	H357 KH16.01	–	Dalsland / Ruotsi	2016	Karen Hansen	unpub.	unpub.
<i>H. spiralis</i>	BHI F214a	–	Grape Island, Boston Harbor Islands, MA / Yhdysvallat	2014	Danny Haelewaters & Jacob Plotnick	MF161204.1	–
<i>H. spiralis</i>	H325	–	Ruotsi	–	–	unpub.	unpub.
<i>H. spiralis</i>	M360	–	–	–	–	unpub.	unpub.
<i>H. spiralis</i>	TNS: F17909	–	Japani	2005	–	JN033440.1	JN086741.1
<i>H. spiralis</i>	KUS: F52652	–	Korea	2009	–	JN033426.1	JN086729.1
<i>H. vitreola</i>	H851 AN976	koivu (<i>Betula</i>)	Häme / Suomi	2021	Aleksi Nirhamo	unpub.	unpub.
<i>H. vitreola</i>	H335 TK7176	–	Virojoki / Suomi	2016	Timo Kosonen	unpub.	unpub.
<i>H. vitreola</i>	H330 TK7171	lehtipuu	Virojoki / Suomi	2016	Timo Kosonen	unpub.	unpub.