

Tartu Ülikool
Botaanika ja ökoloogia instituut
Botaanika õppetool

Ene Kook

***Myosotis laxa* ssp. *caespitosa* ja *Myosotis laxa* ssp. *baltica*
eristumine morfoloogiliste tunnuste ja ITS-järjestuse põhjal**

Magistritöö

Juhendajad: Silvia Pihu
Ülle Reier

Tartu 2005

Sisukord

| | |
|--|----|
| 1. SISSEJUHATUS..... | 3 |
| 1.1. Uuritavad taksonid, nende süstemaatiline kuuluvus ja sünonüümika..... | 3 |
| 1.2. <i>M. laxa</i> ssp. <i>caespitosa</i> , <i>M. laxa</i> ssp. <i>baltica</i> ja <i>M. scorpioides</i> eristamistunnused..... | 4 |
| 1.3. Levik..... | 5 |
| 1.4. <i>M. laxa</i> ssp. <i>baltica</i> kui mikroendeem..... | 7 |
| 1.5. Ökoloogia..... | 10 |
| 1.6. ITS-järjestus molekulaarse tunnusega taimesüstemaatikas..... | 11 |
| 1.7. Eesmärgid..... | 12 |
| 2. MATERJAL JA METOODIKA..... | 13 |
| 2.1. Materjal..... | 13 |
| 2.2. Morfoloogiliste tunnuste analüüs..... | 14 |
| 2.2.1. Uuritavad tunnused..... | 14 |
| 2.2.2. Andmete analüüs..... | 15 |
| 2.2.3. Viljade mõõtmised..... | 15 |
| 2.3. ITS-järjestuse sekveneerimine..... | 16 |
| 2.3.1. Laboratoorne töö..... | 16 |
| 2.3.2. Andmete analüüs..... | 16 |
| 2.4. Taimede kasvatamine..... | 17 |
| 3. TULEMUSED..... | 18 |
| 3.1. Tüübi kirjeldusele vastavad <i>M. laxa</i> ssp. <i>baltica</i> eksemplarid herbariumites ning Sarve ja Rohuküla leiukohtades..... | 18 |
| 3.2. Morfoloogiliste tunnuste analüüs..... | 18 |
| 3.2.1. Peakomponentanalüüs ja diskriminantanalüüs..... | 18 |
| 3.2.2. T-test..... | 20 |
| 3.2.3. Hierarhiline dispersioonanalüüs..... | 21 |
| 3.2.5. Fülogeneesi analüüs..... | 24 |
| 3.3. ITS-järjestuste analüüs..... | 28 |
| 3.4. Taimede kasvatamine..... | 32 |
| 4. ARUTELU..... | 33 |
| KOKKUVÕTE..... | 37 |
| ABSTRACT..... | 39 |
| KIRJANDUS..... | 41 |
| LISAD..... | 46 |

1. SISSEJUHATUS

1.1. Uuritavad taksonid, nende süstemaatiline kuuluvus ja sünonüümika

Käesoleva töö objektiks on kareleheliste sugukonna (*Boraginaceae*) lõosilma perekonna (*Myosotis*) kaks taksonit, *M. laxa* Lehm. ssp. *caespitosa* (Schultz) Hyl. ex Nordh. – muru-lõosilm, ja *M. laxa* Lehm. ssp. *baltica* (Sam.) Hyl. ex Nordh. – balti lõosilm. Paralleelselt taksonitega ssp. *caespitosa* ja ssp. *baltica* uuriti ökoloogilistelt nõudlustelt lähedast liiki *M. scorpioides* L. – soo-lõosilma, kaasati ka *M. arvensis* (L.) Hill – põld-lõosilm – kui võimalik välisrühm.

Kõik nimetatud taksonid kuuluvad perekonna *Myosotis* (lõosilm) sektsiooni *Myosotis*. Sektsioone on tolmutterade morfoloogia, krooni ja emakasuudme mikroskoopiliste tunnuste põhjal kaks – *Myosotis* ja *Exarrhena* (Grau & Schwab 1982). Perekond kuulub sugukonda *Boraginaceae*, seltsi *Solanales* (maavitsalaadsed), mitteformaalsesse rühma pärisasteriidid I (*Euasterids I*). Sugukonna koht pärisasteriidide I rühmas pole täpselt määratletud ja sugukonnasiseste rühmade fülogenees ei ole selge (Judd *et al.* 2002, APG II 2003).

Perekonna *Myosotis* Euroopas esinevaid liike on põhjalikumalt uuritud Saksamaal (Schuster 1967, Grau & Schwab 1982), Poolas (Przyvara 1986/87) ja Rootsis (Apelgren 1986, 1990a, 1990b, 1991).

Eestis esineb sellest perekonnast kümme liiki (Kukk 1999), uuritavad taksonid (välja arvatud *M. arvensis*) kuuluvad seeriasse *Palustres* M. Pop. (Viljasoo 1969, Nikiforova 2001). Balti ja muru-lõosilm ei eristu morfoloogiliste tunnuste alusel selgelt. Nad on alamliigi staatuses enamikus uuemates määrajates ja floorades (Stenberg *et al.* 1992, Lid & Lid 1994, Lazdauskaite *et al.* 1996, Ulvinen 1998). Liigi staatuses on nad Loode-Venemaa taimemäärajas (Tzvelev 2000).

Keerukas eristamine kajastub ka nimetatud taksonite sünonüümikas, kus neid on loetud nii liikideks kui alamliikideks. Lazdauskaite jt. (1996) järgi on nende taksonite sünonüümika järgmine:

Balti lõosilm - *M. laxa* ssp. *baltica* (Sam. ex Lindm) Hyl. ex Nordh. Norsk Fl. 529. 1940 - *M. baltica* Sam. ex Lindm. Svensk Fanerogamfl. Ed. 2. 458. 1926.

Muru-lõosilm - *M. laxa* ssp. *caespitosa* (C. F. Schultz) Hyl. ex Nordh. Norsk Fl. 529. 1940. *M. caespitosa* C. F. Schultz, Prodr. Fl. Stargrad. Suppl. 11. 1819.

Lisaks väärrib märkimist, et mõlemaid taksoneid on käsitletud ka soo-lõosilma alamliikidena – balti lõosilma üks sünonüüme on olnud *M. scorpioides* ssp. *laxa* (Lehm.) Gams in Hegi, Illustr. Fl. Mitt.-Eur. 5. (3): 2165. 1927 ja muru-lõosilmal *M. scorpioides* ssp. *caespitosa* (C. Schultz) Herm. Fl. Deutschl. 384 1912; Gams in Hegi, Illustr. Fl. Mitt.-Eur. 5. (3): 2164. 1927 (Viljasoo 1969).

Käesolevas töös järgitakse Lazdauskaite jt. (1996) kasutatud nimetuste süsteemi.

1.2. *M. laxa* ssp. *caespitosa*, *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. scorpioides* eristamistunnused

M. laxa ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica* kõige rohkem kasutatud eristamistunnused on elutsükli pikkus, õiekrooni läbimõõt, viljarao pikkus, viljunud tupe pikkus, varre pikkus ja juurmiste lehtede seisund õitsemise ajal (Tabel 1). Alamliikide selge eristamine morfoloogiliste tunnuste põhjal pole alati võimalik, sest esineb rohkesti balti ja muru-lõosilma vahepealsete tunnustega vorme. Need vormid võivad olla ühtede tunnuste poolst sarnased ühe alamliigiga ja teiste tunnuste poolst teisega, kuid võivad ka olla kõigi tunnuste poolst kahe alamliigi vahepealsed (Apelgren 1990b). Mõlemad alamliigid on isesobivad ja võimalik, et ka suures osas isetolmlevad, sellistele rühmadele on omane tugev diferentseerumine (Jonsell 1988, Apelgren 1990b).

M. scorpioides ja *M. laxa* s. l. kõige rohkem kasutatud eristamistunnused on õiekrooni läbimõõt, tupe lõhestatus, tupe tipmete kuju, emakakaela suhteline pikkus peale krooni varisemist, varre juurdumine ja võsundite esinemine (Tabel 1). Siiski, püsiva üleujutuse tingimustes võib soo-lõosilm esineda nõrkade vartega veevormina. Vahepealsete tunnustega isendite esinemise tõttu arvatakse, et nii balti ja muru-lõosilm kui ka soo- ja muru-lõosilm võivad anda omavahel hübriide (Viljasoo 1969, Ulvinen 1998). Soo-lõosilmal on olemas ka randades kasvav varieteet *M. scorpioides* var. *praecox* (Hülph.) Jonsell, mis analoogiliselt balti lõosilmaga õitseb lähedastest taksonitest varem ja omab suuremaid vilju (var. *scorpioides* vilja pikkus kuni 1,8 mm, var. *praecox* vilja pikkus kuni 2,5 mm)(Schuster 1967, Przywara 1986/87, Ulvinen 1998).

Balti lõosilma kromosoomiarv on $2n=88$, muru-lõosilma kohta on saadud erinevaid arve $2n=84$, $2n=88$ (Uotila & Pellinen 1985), viimaste andmete järgi siiski $2n=88$ (Apelgren 1991). Mõlemad alamliigid on Läänemere regioonis oktoploidsed (Apelgren 1991).

Tabel 1. *M. scorpioides*, *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* eristamistunnused Samuelssoni (1926), Schusteri (1967), Viljasoo (1969), Lazdauskaite *et al.* (1996) ja Ulvineni (1998) järgi.

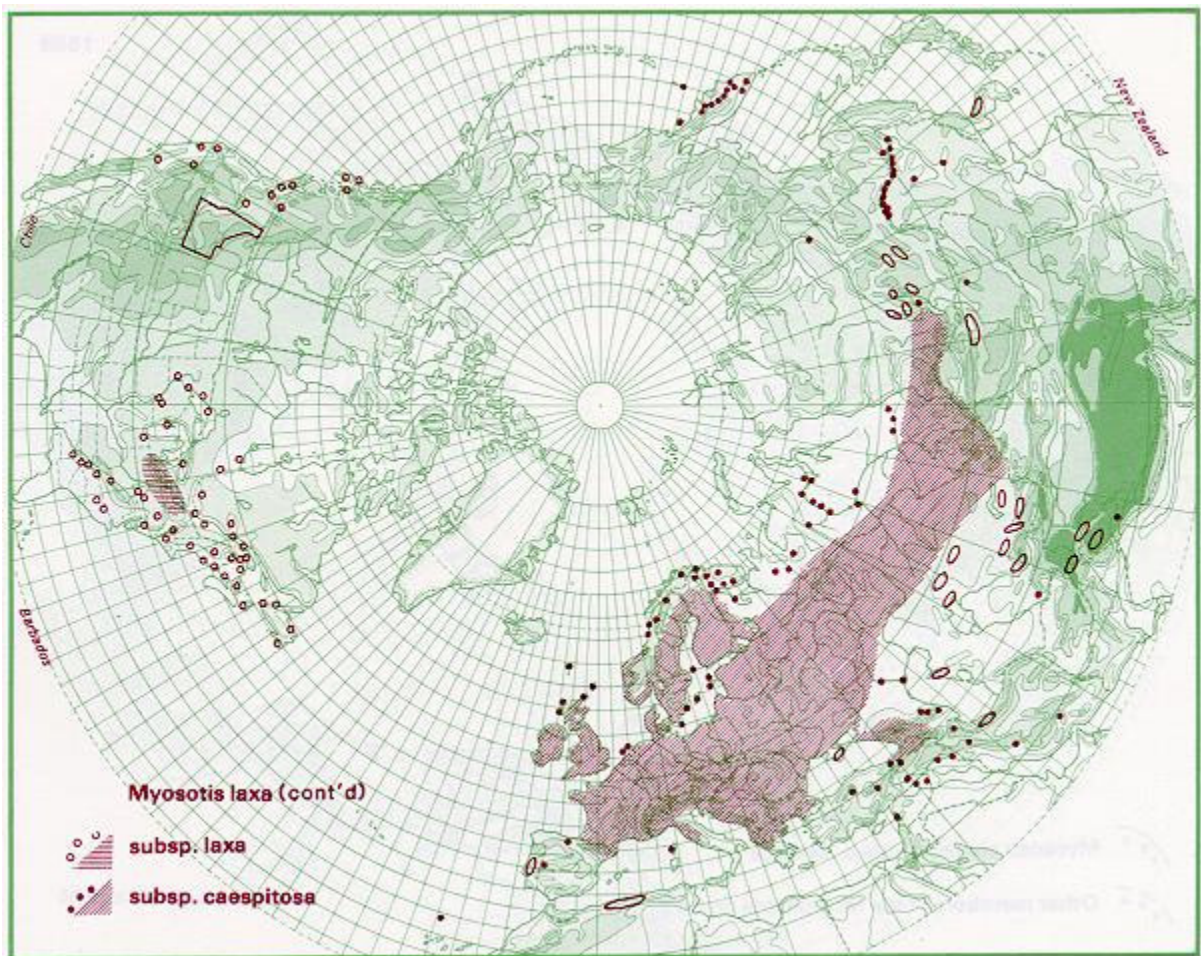
| Tunnus | <i>M. laxa</i> ssp. <i>baltica</i> | <i>M. laxa</i> ssp. <i>caespitosa</i> | <i>M. scorpioides</i> |
|---|--|--|--|
| Elutsükli pikkus | Üheaastane | Ühe-, kahe-, või mitmeaastane | Ühe-, kahe-, või mitmeaastane |
| Taime harunemine | Haruneb tavaliselt alumises osas | Haruneb tavaliselt ülemises osas | Võib olla nii alumises kui ülemises osas harunenud |
| Õisiku lehistumine | Tavaliselt lehistunud | Tavaliselt lehistumata | Tavaliselt lehistumata |
| Õiekrooni läbimõõt | Vähem kui 4 mm | 4-5 mm | 6-10 mm |
| Tupe lõhestatus | Kuni 1/2 pikkusest | Kuni 1/2 pikkusest | Kuni 1/3 pikkusest |
| Tupe tipmete kuju | Piklik-kolmnurksed | Piklik-kolmnurksed | Kolmnurksed |
| Emakakaela suhteline pikkus peale krooni varisemist | Ei ulatu tupest välja | Ei ulatu tupest välja | Ulatub tupest välja |
| Viljunud tupe pikkus | Kuni 8 mm, pikeneb pärast õitsemist tugevalt | Kuni 5 mm, pikeneb pärast õitsemist vähe | Kuni 5 mm, pikeneb pärast õitsemist vähe |
| Viljarao pikkus | Kuni 25 (35) mm | Kuni 10 mm | Kuni 10 mm |
| Vilja suurus | Kuni 2,5 x 1,4 mm | Kuni 1,5 x 1.0 mm | Kuni 1,5 x 1.0 mm |
| Varre tugevus | Peenike ja nõrk | Tugevam kui ssp. <i>baltica</i> vars | Tugevam kui ssp. <i>baltica</i> vars |
| Varre pikkus | Kuni 30 cm | Kuni 50 cm | Kuni 50 cm |
| Varre juurdumine | Ei juurdu | Ei juurdu | Võib alusel juurduda |
| Võsundite esinemine | Puuduvad | Puuduvad | Võivad esineda |
| Juurmiste lehtede seisund õitsemise ajal | Tavaliselt kuivanud | Tavaliselt pole kuivanud | Tavaliselt pole kuivanud |
| Õitsemise aeg | Mai- juuli | Juuni-september | Juuni-september |

1.3. Levik

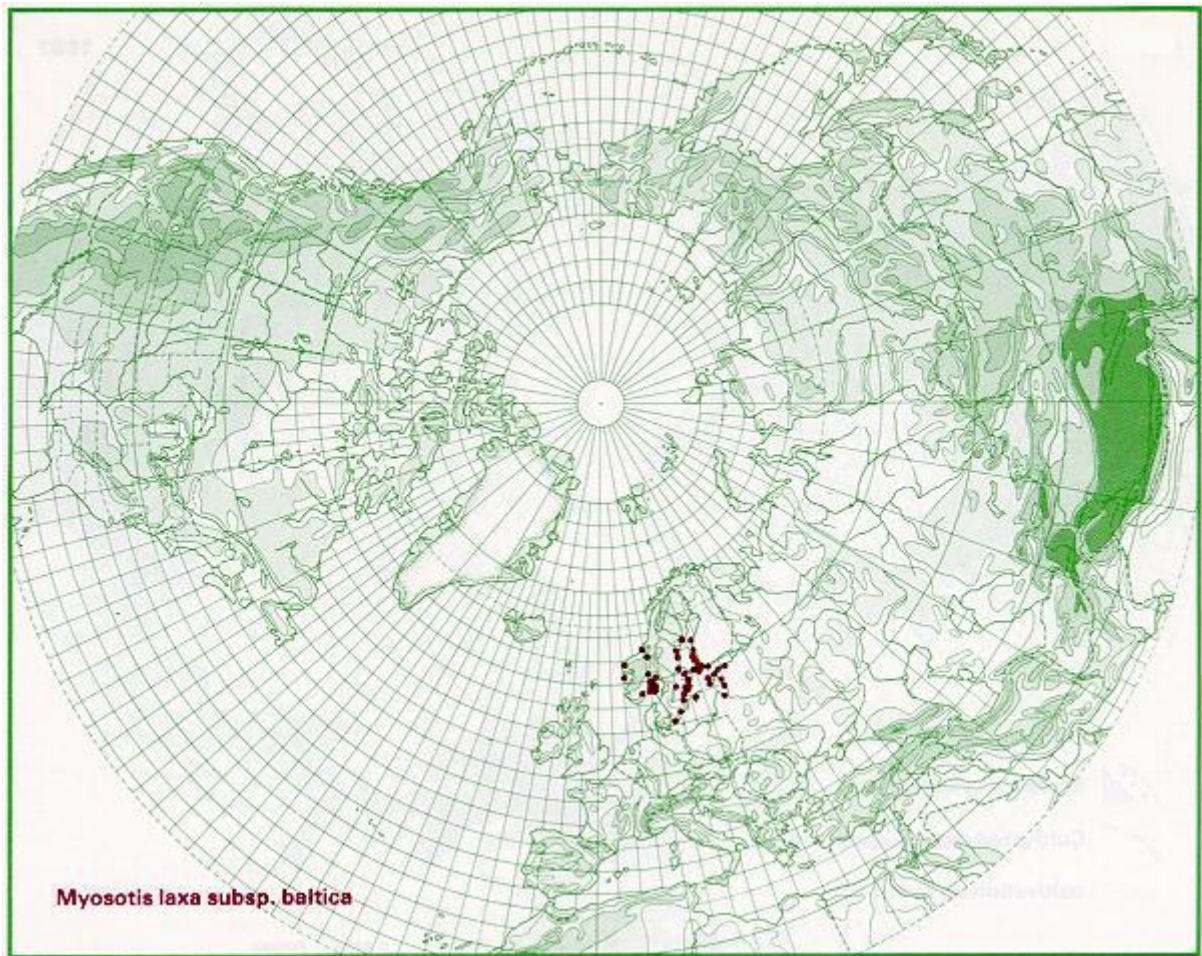
Ligikaudu 100-liigilise perekonna *Myosotis* areaal paikneb nii põhja- kui ka lõunapoolkera parasvöötmes ja mõned taksonid esinevad ka troopilistel aladel mägedes. Esineb kaks mitmekesisuse tsentrumit – Euraasia lääneosas (ligikaudu 60 liiki) ja Uus-Meremaal (ligikaudu 35 liiki), kusjuures sektsioon *Myosotis* on levinud põhjapoolkeral, *Exarrhena* lõunapoolkeral (Grau & Schwab 1982, Al-Shehbaz 1991). Erandiks on väike liikide grupp sektsioonist *Exarrhena*, mis on levinud Euraasias, kuid tolmuterade morfoloogia põhjal on lähedases suguluses lõunapoolkera liikidega (Grau & Schwab 1982). Sellesse gruppi kuulub näiteks *Myosotis discolor* Pers., mida on Eestist leitud kahel korral eelmise sajandi alguses (Viljasoo 1969). Molekulaarsed tunnused toetavad hüpoteesi perekonna tekkest põhjapoolkeral (Judd *et al.* 2002, Winkworth *et al.* 2002).

Myosotis laxa ssp. *caespitosa* areaal hõlmab Euraasia põhjaosa, ssp. *baltica* areaal piirdub Läänemere regiooniga, lisanduvad mõned leiukohad Lääne-Rootsis ja Norras (Joonis 1, 2, Hultén & Fries 1986). *M. laxa* ssp. *laxa* on ühe allika andmetel loetud amfiatlantiliseks

taksoniks (Lid 1994), kuid sellisel juhul sisaldub temas ka *M. laxa* ssp. *baltica* (Lid 1994). *M. laxa* s. l., mis hõlmab kolme alamliiki (ka *M. laxa* Lehm. ssp. *laxa*, levinud Põhja-Ameerikas) loetakse tsirkumpolaarseks taksoniks (Hultén & Fries 1986). Viljasoo (1969) andmetel kasvab balti lõosilm ka Altai, Kesk-Aasia põhjaosas ning Araali-Kaspia ümbruses (Viljasoo 1969). See on siiski tõenäoliselt viga, kuna nimetatud piirkondadesse ulatub ainult *M. laxa* ssp. *caespitosa* areaal, kuid *M. laxa* ssp. *baltica* areaal mitte (Hultén & Fries 1986), lisaks peetakse taksonit *M. laxa* ssp. *baltica* Läänemere regioonis, täpsemalt Ahvenamaa saarestikus pärastjäaaegselt tekkinud endemiks (Jonsell 1988, Apelgren 1991).



Joonis 1. *M. laxa* ssp. *caespitosa* levik põhjapoolkeral (Hultén & Fries 1986).



Joonis 2. *M. laxa* ssp. *baltica* levik põhjapoolkeral (Hultén & Fries 1986).

1.4. *M. laxa* ssp. *baltica* kui mikroendeem

Kuigi pärastjääaegset perioodi peetakse üldiselt liiga lühikeseks ajaks, et saaks tekkida endeemseid liike (Ingelög *et al* 1993), kiirendavad populatsioonide eristumist Ahvenamaa saarestiku ja Botnia lahe rannaaladel maakerge, veetaseme ja soolsuse aastaajalised muutused ning vee- ja jääerosioon (Jonsell 1988). Jonsell (1988) on eristanud grupi rannikute mikroendeeme (mikroendeem – morfoloogiliselt eristatav üksus, mis on saavutanud teatava leviku Põhjamaade mingis osas), kuhu kuulub ka *M. laxa* ssp. *baltica*. Rannikute mikroendeemide iseloomulikud tunnused on üheaastasus, varane õitsemine kevadel (kooskõlas madala veetasemega ja soodsaima perioodiga tõusmete arenguks), elutsükli kiirem läbimine võrreldes lähedaste taksonitega ning isetolmlemine.

Mikroendeemid erinevad nende tunnuste poolest samas piirkonnas kasvavatest süstemaatiliselt lähedastest taksonitest (Jonsell 1988).

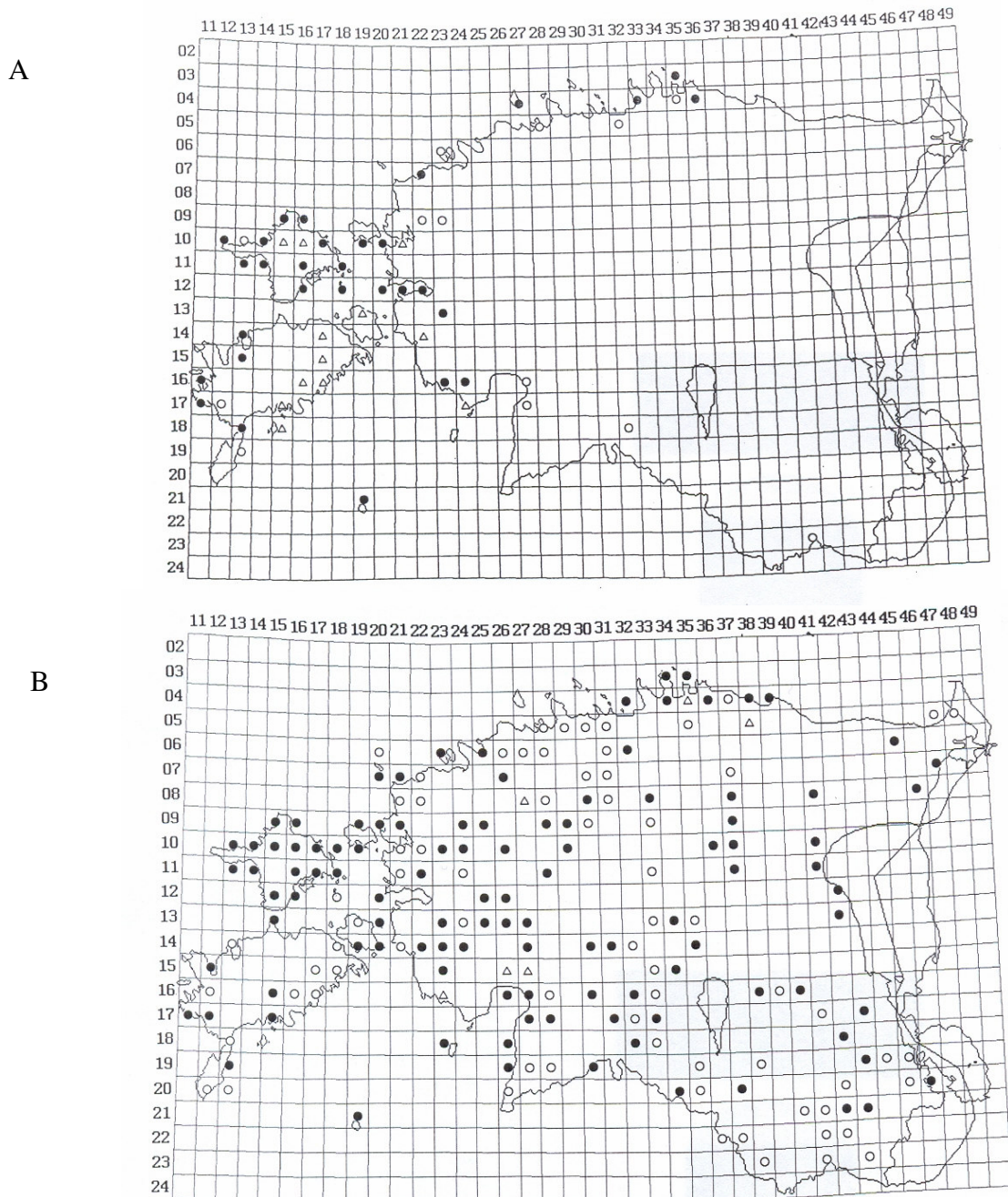
Esimesena märkas soome botaanik Lindberg (1915) lõosilma erilist vormi Ahvenamaa saarestikus ja kirjeldas teda kui tavaliselt Põhja-Ameerika levikuga taksonit *M. laxa*. Seda kirjeldust ei aktsepteeritud täielikult. Samuelsson (1926) kirjeldas sama vormi kui uut liiki *M. baltica*. Hiljem Lindberg nõustus, et 1915. aastal Põhja-Ameerika taimena kirjeldatud *M. laxa* on tegelikult samastatav liigiga *M. baltica* (Lindberg 1933).

M. laxa ssp. *baltica* esinemissagedus areaali piires räägib endeemsuse kasuks. Edela-Soomes ja Ahvenamaal on *M. laxa* ssp. *baltica* loetud sagedaseks taksoniks (Ulvinen 1998). Sagedus väheneb liikudes oletatavast tekketsentrist (Ahvenamaa saarestik) piki Soome rannikut põhja poole (Palmgren 1961, Apelgren 1990a). Eesti aladel on *M. laxa* ssp. *baltica* levinud põhiliselt Lääne-Eestis ja saartel (Joonis 3A), esinedes suhteliselt harva (Viljasoo 1969, Vissak 1991, Ploompuu 1995, Mägi 1997, Rebassoo 1997). Erandina on Rebassoo (1960) täheldanud *M. laxa* ssp. *baltica* ohtrat esinemist Hiiumaa Laidude Kaitsealasse kuuluval Vareslaiul ja massilist esinemist Käina lahes asuvatel Vasikalaiul ja Ristlaiul. Erinevalt balti lõosilmast on muru-lõosilm oma areaali piires sage või hajusalt esinev, tema kasvukohti leidub nii soolasest kui magedast veest mõjustatud niisketel aladel (Joonis 3B). Põhjamaades, Lätis, Leedus ning Loode-Venemaal on ssp. *baltica* samuti haruldane või harvaesinev ning ssp. *caespitosa* tavalisem (Apelgren 1986, 1991, Stenberg *et al.* 1992, Lazdauskaite *et al.* 1996, Ulvinen 1998, Tzvelev 2000).

Palmgreni (1927) uurimuse andmetel, mis käsitleb taimede sisserännet Ahvenamaa saarestikku, *M. baltica* Eestis ei esine ja seejuures on viidatud ka Eestist pärinevatele andmetele (Kupffer 1925). Kuigi vanimad herbaareksemplarid Eesti Põllumajandusülikooli Põllumajandus- ja Keskkonnainstituudi (PKI) Herbaariumi (TAA) Eesti taimede kogus ning Tartu Ülikooli Botaanika ja Ökoloogia Instituudi Eesti Herbaariumis (TU) pärinevad tõesti veidi hilisemast ajast (alates 1933, Lisa 1), võiks siiski arvata vastupidist, sest *M. baltica* kirjeldati esmakordselt selle nime all 1926. aastal (Samuelsson 1926) ja võis Eestis ka siis juba olemas olla, aga teda polnud kogutud ega kirjeldatud aasta varem ilmunud Kupfferi töös selle nime all.

Arvamust, et *M. laxa* ssp. *baltica* Eestis ei esine (Palmgren 1927, 1961) on ilmselt toetanud asjaolud, et *M. laxa* ssp. *baltica* viljadel ega seemnetel pole erilisi levimisvahendeid ja et pindmised veekihid liiguvad Eesti läänesaarte rannikult ja Soome lahest põhja poole ega soodusta seega vesilevi Ahvenamaalt lõuna suunas (Palmén 1930).

Viimases suuremas uurimuses, mis käsitleb taksonit *M. laxa* s.lat. Läänemere regioonis (Apelgren 1990b, 1991) on kasutatud Soome ja Rootsi herbariumites asuvat Eestist pärinevat materjali ja nenditakse, et need taimed erinevad Rootsi ja Soome taimedest. Samas esineb ssp. *baltica* Eestis Põhja-Euroopa soontaimede levikuatlase kaardi (Hultén & Fries 1986) ja ka määrajate ning floorade andmetel (Viljasoo 1969, Lazdauskaite *et al.* 1996, Reier 1999).



Joonis 3. *M. laxa* ssp. *baltica* (A) ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* (B) levik Eestis. (Eesti soontaimede levikuatlas, andmebaas EPMÜ Põllumajandus- ja Keskkonnainstituudis).

● – liiki on sellest kohast leitud peale 1970. aastat; ○ – liiki on leitud vahemikus 1920-1970; △ - liiki on leitud enne 1920. aastat.

1.5. Ökoloogia

Lõosilma perekonna Eestis esinevad liigid kasvavad nii niisketes kui ka kuivades kasvukohtades (Viljasoo 1969). Uuritavad taksonid, *M. laxa* ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica*, on niiskete kasvukohtade taimed, samuti soo-lõosilm *M. scorpioides* L. Välisrühmana kasutatud põld-lõosilm (*M. arvensis* (L.) Hill) kasvab kuivades kasvukohtades, olles oma areaali piires tavaline taim kuivadel niitudel, nõlvadel, teede ääres, põllu- ja aiaumbrohuna (Viljasoo 1969).

M. scorpioides on tavaline niiskete kasvukohtade liik, mis on põhjapoolkeral laialdaselt levinud. Kirjanduse andmetel esineb tal Läänemere randades kasvav varieteet *M. scorpioides* var. *praecox* (Hülph.) Jonsell (Apelgren 1986, Ulvinen 1998). Olenevalt kasvukohatingimustest võib *M. scorpioides* tugevalt varieeruda, aegade jooksul on eristatud rida alamliike, varieteete ja vorme. Põhjusteks peetakse kloonide vegetatiivset paljunemist ja *M. scorpioides* ja *M. laxa* s. l. vahelisi hübriide (Schuster 1967, Viljasoo 1969, Grau & Merxmüller 1972, Hulten & Fries 1986, Przyvara 1986/87, Ulvinen 1998).

M. laxa ssp. *baltica* kasvab rannaniitudel ja mererandades soolase vee mõjupiirkonnas, kus vegetatsiooniperioodi ajal võivad nii niiskus kui soolsus märgatavalt kõikuda, lisaks esineb ka erosiooni või adruvalli mattumise oht. Kõrge veetase sügisel põhjustab rannaaladel ka jääerosiooni (Ericson & Wallentinus 1979).

M. laxa ssp. *caespitosa* kasvab mitmesugustes niisketes kasvukohtades, sh. ka mererandades ja rannaniitudel koos alamliigiga ssp. *baltica* (Viljasoo 1969, autori andmed).

M. laxa ssp. *baltica* mitmed iseloomulikud tunnused (Tabel 1) kujutavadki endast kohastumusi fluktuervatele looduslikele tingimustele. Suuremad seemned võimaldavad erinevatel taimeliikidel kiiremat idanemist ja kasvu, samuti võimaldavad kasvada ebasoodsates tingimustes, näiteks pimeas, mis on oluline adru, liiva vm. alla mattumisel (Harper 1977, Weller 1985, Baskin & Baskin 1998). Seemnete suurus on üldiselt päritav, väga konstantne ja kõige vähem plastiline morfoloogiline tunnus; kui seemned suuruse poolest erinevad, siis on sageli tegemist adaptiivse polümorfismiga (Harper 1977). *M. laxa* ssp. *baltica* läbib oma elutsükli sel ajal kui Läänemeres on madalaim veetase, õitsedes maist juulini (Ericson & Wallentinus 1979, Apelgren 1991). Õied moodustuvad ka varre alumistel sõlmedel, tulemuseks hõre lehistunud õisik; õitsemine algab suhteliselt kiiresti peale idanemist. Kultuuris kasvatamisel alustab *M. laxa* ssp. *baltica* õitsemist kuus nädalat peale külvi, umbes kaks nädalat varem kui *M. laxa* ssp. *caespitosa* (Apelgren 1986, 1991),

kelle õitsemissaeg ulatub augustini, kahe allika (Lazdauskaite *et al.* 1996, Cepurīte 2003) andmetel septembrini. Sügisese kõrge veetaseme ajaks on üheaastane taim oma elutsükli läbinud. Kultuuris kasvatamine on näidanud tunnuste püsimist, järelkult peaksid nad olema geneetiliselt määratud (Apelgren 1990b, 1991).

1.6. ITS-järjestus molekulaarse tunnusena taimesüstemaatikas

Molekulaarsete tunnustena kasutatakse õistaimede süstemaatikas nii kloroplasti, mitokondri kui ka tuuma DNA järjestusi (Judd *et al.* 2002, APG II 2003). Lähedaste perekondade, liikide ja liigisiseste üksuste eristamiseks sobivad paremini tuuma DNA järjestused, kuna nad muteeruvad kiiremini kui kloroplasti ja mitokondri DNA. Hästi kasutatavad on paljukoopiaalsed tuuma DNA järjestused, nagu näiteks ribosomaalne DNA (rDNA – tuuma rRNA geenid ja geenidevahelised alad). Ribosomaalne DNA koosneb 18S, 26S ja 5.8S geenidest ja ITS1 ja ITS2 (*internal transcribed spacer* – transkribeeritav mittekodeeriv geenidevaheline ala) järjestustest. Geenid on konservatiivsed, kuid ITS1 ja ITS2 muteeruvad suhteliselt kiiresti. ITS kujutab endast kaheosalist mittekodeerivat transkribeeritavat (regulatsiooni ülesandega) DNA järjestust, mille vahel on 5.8S geen (Judd *et al.* 2002).

ITS-piirkond on õistaimede süstemaatikas kõige rohkem kasutatud molekulaarne marker (Hershkovitz *et al.* 1999). Kuigi on avaldatud arvamust, et paljukoopiaalne ITS võib olla populatsioonisiselt ning koguni isendi piires suuresti varieeruv ning isendisene varieeruvus võib olla suurem gruppidevahelisest, ja seetõttu ei pruugi ITS sobida võrreldavaks tunnuseks (Alvarez and Wendel 2003, Bailey 2003), kasutatakse teda ka praegusel ajal soontaimede sugulussuhete uurimisel nii liigi kui ka sellest madalamatel ja kõrgematel tasanditel, ning enamasti ITS-piirkonna andmed toetavad sugulussuhteid, mis on järeldatud kloroplastigeenide andmetest või morfoloogiast (Judd *et al.* 2002, Winkworth *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2004).

Mõnel juhul on lähedaste liikide puhul ITS-järjestuste varieeruvus olnud fülogeneesi selgitamisel ebapiisav. Seetõttu pole ka tõenäoline, et paraloogid oleks piisavalt erinevad, et toetada ebakorrektsel evolutsioonipuud. Suurema varieeruvuse korral on homogeniseerumine piisav, et fikseerida taksonitevahelised erinevused, nii et isendisised vähesed mutatsioonid ei tohiks avaldada mõju fülogeneesi interpretatsioonile (Hershkovitz *et al.* 1999).

ITS-järjestusi on varem kasutatud nii lõosilma perekonna kui ka kareleheliste sugukonna teiste perekondade fülogeneesi kirjeldamisel koos geenide *atpB*, *matK*, *ndhF*, *trnL* ja geenidevahelise ala *psbA-trnA* järjestustega (Långström 2002, Winkworth *et al.* 2002, Hilger *et al.* 2004). Långströmi (2002) poolt välja pakutud kareleheliste fülogeneesipuul (*atpB* järjestuse põhjal koostatud) on lõosilma perekonna asukoht alamsugukonnas *Cynoglosseae* nõrga (alla 50%) kingapaelameetodil arvatud toetusega. Uurimuses, mis käsitleb lõosilma perekonna päritolu ja evolutsiooni lõuna- ja põhjapoolkeral (Winkworth *et al.* 2002), paikneb *M. laxa* ssp. *caespitosa* ITS-järjestuste põhjal koostatud evolutsioonipuul ühes klaadis koos liikidega *M. rehsteineri* ja *M. debilis* ja selle klaadi kingapaelameetodil arvatud toetus on 96%. Alamliiki *M. laxa* ssp. *baltica* selles töös uuritud ei ole.

Kuna taksonid *M. laxa* ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica* on sama liigi alamliigid, siis võib arvata, et erinevate geenide järjestused on nendel väga sarnased. ITS-järjestused muteeruvad kiiremini kui geenid ja mutatsioonide suurem hulk võrreldes konservatiivsete geenidega võiks anda võimaluse alamliikide ja populatsioonide selgeks eristamiseks ITS-järjestuste põhjal, kuid see väide vajab kontrollimist.

1. 7. Eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgid on järgmised:

- 1) analüüsida *M. laxa* ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica* eristamisel seni kasutusel olnud morfoloogiliste tunnuste sobivust;
- 2) selgitada, kas endemne takson *M. laxa* ssp. *baltica* esineb Eesti aladel;
- 3) kontrollida, kas perekond *Myosotis* ser. *Palustres* liigid eristuvad ITS-järjestuse alusel;
- 4) selgitada välja *M. laxa* ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica* vaheline sugulus ITS-järjestuse alusel.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Materjal

Jälgides isendite vastavust tüübi kirjeldusele (Tabel 1) vaadati läbi 72 *M. laxa* ssp. *baltica* (sh *M. baltica* Sam., *M. laxa* Lehm.) herbaareksemplari kolmest herbaariumist: EPMÜ Põllumajandus- ja Keskkonnainstituudi (PKI) Herbaarium (TAA), TÜ BÖI Eesti Herbaarium ja *Herbarium Generale* (TU), fikseeriti tüübi kirjeldustele vastavate tunnustega isenditega herbaareksemplaride arv ja dateeringud (Lisa 1). Samuti vaadati läbi 15 Kew Kuningliku Botaanikaiaia (K) herbaareksemplari (7 ssp. *baltica*, 8 ssp. *caespitosa*, kogutud Rootsist ja Soomest) ja 15 Berliini Ülikooli Herbaariumi (B) eksemplari (5 ssp. *baltica*, 10 ssp. *caespitosa*).

Aastatel 2002- 2003 koguti juuni lõpus-juuli alguses 159 taime taksonitest *M. laxa* ssp. *caespitosa* (67 taime), *M. laxa* ssp. *baltica* (62 taime), *M. scorpioides* (20 taime) ja *M. arvensis* (L) Hill. (10 taime). Taimed koguti 15 populatsioonist 11 leiukohast Hiiumaalt ja Läänemaalt (Lisa 2, Lisa 3, Lisa 4). Eesmärgiks oli koguda igast populatsioonist 10 elujõulist taime, millel on nii õied kui ka viljad, kuid igas populatsioonis ei olnud sobivaid taimi piisaval arvul. Kuna *M. laxa* ssp. *baltica* on Eestis harvaesinev, siis otsiti teda põhiliselt levikukaardile kantud leiukohtadest. Enamik *M. laxa* ssp. *caespitosa* isendeid koguti samadest leiukohtadest, kust ssp. *baltica*. Kahes leiukohas kasvas ainult *M. laxa* ssp. *caespitosa* ja ühes ainult *M. laxa* ssp. *baltica* (Lisa 3, Lisa 4).

Kõigil taimedel mõõdeti 15 morfoloogilist tunnust, määrati nende alusel alamliik ja võeti leheproov DNA eraldamiseks. Leheprooviks võeti igalt taimelt üks (väiksemate lehtede puhul kaks) noor kahjustamata leht. Seejärel taimed herbariseeriti.

Leheproove kuivatati kahel viisil: 2002. aastal kogutud proovid külmutati -18 °C juures ja kuivatati lüofilisaatoriga, 2003. aastal kogutud proovid kuivatati silikageelis. Mõlemal juhul säilitati kuivatatud proovid külmutatuna (-18 °C).

Taimedelt, millel olid viljad kogumise ajal valminud, koguti ka vilju, kokku 150 vilja 30 taimelt. Alamliigiti jagunes valim järgmiselt: *M. laxa* ssp. *caespitosa* 13 taimelt kokku 72 vilja ja *M. laxa* ssp. *baltica* 17 taimelt kokku 78 vilja. Vilju koguti nelja leiukoha (Tiharu, Luidja 1, Luidja 2, Rohuküla) taimedelt (Lisa 4).

2.2. Morfoloogiliste tunnuste analüüs

2.2.1. Uuritavad tunnused

Kogutud taimedel mõõdeti 15 tunnust (Tabel 2). Tunnuste valikul lähtuti ssp. *baltica* ja ssp. *caespitosa* eristamistunnustest (Samuelsson 1926, Lindberg 1933), ning *M. scorpioides* tähtsamatest eristamistunnustest, mida on erinevates määrajates ja floorades rohkem kasutatud (Tabel 1). Lisandusid veel mõned tunnused, mille väärtused samade allikate põhjal uuritavatel taksonitel erinesid (2, 6, 7, 9, 13, 14, 15).

Tabel 2. Mõõdetud morfoloogilised tunnused ja nende kodeerimine.

| Tunnus | Seisundid, kodeerimine |
|---|---|
| 1. õisikus olevate lehtede arv | 0-6 |
| 2. õisiku hõredus: | õisik hõre (0) (alumiste viljaraagude vahed märgatavalt pikemad kui ülemistel) õisik tihe (1) (alumiste viljaraagude vahed ligikaudu sama pikad kui ülemistel) |
| 3. pikima viljarao pikkus: | 0-5 mm (1); 6-10 mm (2); 11-15 mm (3); üle 15 mm (4) |
| 4. tupe pikkus pikimal raol: | 4-5 mm (1); 6-7 mm (2); 8-9 mm (3) |
| 5. taime harunemise viis: | taim harunemata (0); ülaosas harunenud (1); kogu varre ulatuses harunenud (2); alumises osas harunenud (3) |
| 6. varre läbimõõt alusel (juurekaelal): | kuni 1 mm (1); 1-2mm (2); 3-4mm (3) |
| 7. varre läbimõõt õisiku all: | kuni 1mm (1); 1-2 mm (2); üle 2 mm (3) |
| 8. varre alumise osa värv | punakas (1); ei ole punakas (0) |
| 9. tupe lõhestatus | ühe kolmandikuni tupe pikkusest (1); sügavamalt (2) |
| 10. juurmiste lehtede seisund õitsemise ajal: | rohelised (1); kuivanud (2) |
| 11. varre kuju alumises osas | kandiline (1); ei ole kandiline (0) |
| 12. õiekrooni keskmine läbimõõt kahe täielikult avanenud krooni läbimõõdu põhjal: | 1-3 mm (1); 4-6 mm (2); 7-10 mm (3) |
| 13. Lehe pikkuse ja laiuse suhe (varre keskosa kahe lehe mõõtmete alusel): | 1,5 –2,9(1); 3,0-3,9 (2); 4,0-4,9 (3); 5,0-5,9 (4); 6,0-6,9 (5) |
| 15. võsundid | esinevad (1); puuduvad (0) |

2.2.2. Andmete analüüs

Morfoloogilisi tunnuseid analüüsiti järgmiselt: taksonite *M. scorpioides*, *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* kohta tehti peakomponentanalüüs, saamaks teada kolme taksoni eristumist üksteisest kõigi kasutatud tunnuste põhjal. Liikide eristumist kontrolliti ka diskriminantanalüüsi abil. Keskmiste väärtuste võrdlemiseks tehti t-test ja selgitati välja, millised tunnused on statistiliselt olulised *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* omavahelisel eristamisel. Arvutustes kasutati lehti iseloomustava tunnusena pikkuse ja laiuse keskmiste väärtuste suhet, seega kasutati 14 morfoloogilist tunnust. Olulisuse nivooks loeti 0,05.

Saamaks teada, kas ühes leiukohas kasvavad taimed on sarnasemad kui erinevate leiukohtade taimed, tehti hierarhiline dispersioonanalüüs üheksa leiukoha *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* kohta, keskendudes nendele statistiliselt olulistele eristamistunnustele, mida on sagedamini kasutatud määrajates. Lisaks analüüsiti populatsioone ka varre alumise osa värvi osas, kuna see tunnus osutus statistiliselt oluliseks. Tunnuste keskmiste väärtuste võrdlemiseks tehti Tukey test.

Klasteranalüüsi (UPGMA, Manhattani kaugus) abil uuriti, kuidas kahe alamliigi isendite valim rühmitub, kui faktor 'liik' on kõrvale jäetud. Kasutati programmpaketti STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc. 2001).

Programmi PAUP 4.0b10 abil tehti fülogeneesianalüüs, kasutades parsimooniaprintsiipi (Swofford 1998).

M. arvensis jäeti nendest analüüsides välja, kuna ta kuulub seeriasse *Arvenses* (*M. scorpioides*, *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* kuuluvad seeriasse *Palustres*) ja eristub ülejäänud kolmest hästi nii morfoloogiliste tunnuste kui ka ökoloogiliste nõudluste poolest (Viljasoo 1969).

2.2.3. Viljade mõõtmed

Kuna vilju ei olnud võimalik koguda kõigilt uuritavatelt isenditelt, siis jäeti neid iseloomustavad andmed üldisest morfoloogiliste tunnuste analüüsist välja. Igal viljal mõõdeti pikkus ja laius binokulaari MBS – 2 abil (suurendus 40 korda). Programmiga STATISTICA arvutati ssp. *baltica* ja ssp. *caespitosa* viljade keskmised mõõtmed ja 95% usalduspiirid. Erinevuste olulisuse hindamiseks tehti t-test.

2.3. ITS-järjestuse sekveneerimine

2.3.1. Laboratoorne töö

DNA eraldamiseks leheproovidest kasutati Doyle & Doyle meetodikat (Doyle & Doyle 1990). ITS-piirkond amplifitseeriti 25 µl mahus järgmise protokollil alusel: 1 µl 250 µM dNTP (desoksüribonukleotiidide segu), 2,5 µl 10x PCR (*polymerase chain reaction* – DNA amplifikatsioon) puhvri ja MgSO₄ segu, 0,4 µl (1U) Pfu polümeraasi (MBI Fermentas), 1,6 µl (15 pmol) praimereid ITS4 ja ITS5 (vt. allpool), 1 µl DNA lahust, 18,5 µl deioniseeritud vett, 0,001 mg BSA-d (*bovine serum albumin* – veise seerumi albumiin).

Kasutatud praimerite järjestused olid järgmised (White *et al.* 1990):

ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

ITS5 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'

Amplifitseerimisreaktsioonid viidi läbi amplifikaatoris Mastercycler® personal (Eppendorf AG) järgmise programmiga: denaturatsioon 94 °C - 2 min, 35 tsüklit 94 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 1 min ja lõplik polümeriseerimine 72 °C 10 min.

Saadud PCR produkte puhastati kahel viisil: nukleasi ja fosfataasi seguga puhvris (Exo-Sap-IT™, USB Corporation, USA) ja UltraClean™ 15 DNA Purification Kit-i (Mo Bio Laboratories Inc., USA) abil, järgides tootja protokollit.

Sekveneerimiseks kasutati kahte erinevat kit-i: põhiliselt Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit-i (Amersham Biosciences) ja osa PCR produktide puhul Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit-i (Amersham Biosciences), kasutati sekvenaatorit ALFexpress II (Amersham Biosciences). Erinevaid meetodeid katsetati paremate tulemuste saavutamiseks.

2.3.2. Andmete analüüs

Saadud järjestusi töödeldi programmiga ALFwin™ Sequence Analyser 2.00 (Amersham Biosciences), aligneeriti programmiga BioEdit (Hall 1999) ja võrreldi nende sarnasust andmebaasis GenBank oleva *M. laxa* ssp. *caespitosa* (ITS: AY 092914) ja *M. arvensis* (ITS: AY092908) ITS-järjestustega. Seejärel tehti fülogeneesi analüüs programmiga PAUP 4.0b10 (Swofford 1998), kuhu peale sekveneeritud järjestuste kaasati kümne erinevast liigist lõosilma ITS-järjestused (Tabel 3). Liigid valiti lähtudes varasemast (Winkworth *et al.* 2002) perekonna *Myosotis* ITS-järjestuste alusel koostatud

fülogeneesipuust. Analüüsi kaasati *M. laxa* ssp. *caespitosa* sõsarliik (*Myosotis rehsteineri* Wartm.) ning vähemalt üks liik igast suuremast fülogeneesipuu harust. Geneetilise varieeruvuse selgitamiseks alamliikide vahel ning sees tehti molekulaarne dispersioonanalüüs (AMOVA – analysis of molecular variance) programmiga Arlequin 2.000 (Schneider *et al.* 2000).

Tabel 3. ITS-järjestuse põhjal tehtud fülogeneesianalüüsis kasutatud lõosilmade (*Myosotis*) ITS-järjestuste koodid (GenBank).

| Takson | Kood |
|---|----------|
| <i>Myosotis arvensis</i> (L.) Hill | AY092908 |
| <i>Myosotis australis</i> R. Br. | AY092909 |
| <i>Myosotis alpestris</i> F.W. Schmidt | AY092907 |
| <i>Myosotis cadmea</i> Boiss. | AY092913 |
| <i>Myosotis debilis</i> Pomel | AY092917 |
| <i>Myosotis discolor</i> Pers. | AY092919 |
| <i>Myosotis laxa</i> ssp. <i>caespitosa</i> (C.F. Schultz) Hyl. | AY092914 |
| <i>Myosotis refracta</i> Boiss. ssp. <i>refracta</i> | AY092930 |
| <i>Myosotis rehsteineri</i> Wartm. | AY092931 |
| <i>Myosotis verna</i> Nutt. | AY092936 |

2.4. Taimede kasvatamine

M. laxa ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica* stratifitseerimata seemneid idandati 9 päeva jooksul niiskel filterpaberil (õhutemperatuur +25 °C).

Idanemata seemneid stratifitseeriti 18 päeva temperatuuril +4 °C (1. VIII 2003 – 18.VIII 2003). Mõlema alamliigi seemned hakkasid idanema järgmisel päeval pärast stratifitseerimise lõppu (19.VIII). Taimed istutati 26. VIII ja 1. IX plastpottidesse neutraliseeritud turbamulda ja neid kasvatati Lai tn. 36 laboris (õhutemperatuur +25°C, päeva pikkus 18,5 tundi) novembrini, kastes vastavalt vajadusele. Registreeriti taimede õitsemise algus. Siis viidi taimed talvituma TÜ Botaanikaiaia Pirni tn. osakonda kasvuhoonesse, kus õhutemperatuur oli 2-5°C. 17. IV 2004 registreeriti, kas taimed on talve üle elanud või mitte.

3. TULEMUSED

3.1. Tüübi kirjeldusele vastavad *M. laxa* ssp. *baltica* eksemplarid herbaariumites ning Sarve ja Rohuküla leiukohtades

Eestist kogutud tüübi kirjeldusele vastavaid *M. laxa* ssp. *baltica* herbaareksemplare oli herbaariumites kokku 20: EPMÜ PKI Herbaariumis 14 eksemplari ja TÜ BÖI Eesti Herbaariumis 6 eksemplari (Lisa 1). TÜ BÖI Herbarium Generale ainuke tüübi kirjeldusele vastav herbaareksemplar pärines Soomest. Vanim Eesti eksemplar oli kogutud 1932. aastal Virumaalt, Kuusalust põhjas asuvalt mererannalt, kus nad kasvasid liivasel pinnal. Kõik need tüübi kirjeldusele vastavad eksemplarid olid ka õigesti määratud.

Kew Kuningliku Botaanikaia Herbaariumi 15 läbivaadatud herbaareksemplari seas oli 8 *M. laxa* ssp. *caespitosa* eksemplari ja 7 *M. laxa* ssp. *baltica* eksemplari, millest tüübi kirjeldusele vastavaid *M. laxa* ssp. *baltica* herbaareksemplare oli 5. Tüübi kirjeldusele vastavad eksemplarid pärinesid Läänemere rannaladelt Rootsist ja Soomest, üks eksemplar oli kogutud Norrast. Berliini Ülikooli Herbaariumi eksemplaride seas (15 eksemplari kokku, neist 10 ssp. *caespitosa*), kus oli 5 *M. laxa* ssp. *baltica* eksemplari, puudus tüüpiliste tunnustega *M. laxa* ssp. *baltica*. Selle nime all oli esitatud eksemplarid erinesid tüübi kirjeldusest.

Välitööde käigus koguti 21 tüüpiliste tunnustega taime alamliigist *M. laxa* ssp. *baltica*. Taimed pärinesid Rohuküla populatsioonist Läänemaal ja Sarve populatsioonist Hiiumaal (Lisa 2). Nende populatsioonide kasvukohad olid ka täpselt sellised, nagu neid on varasemate uurijate poolt kirjeldatud: mererannas veepiiril, kus ümbritsev taimestik on pigem hõre. Ülejäänud populatsioonide kasvukohad erinesid kõik rohkemal või vähemal määral ülalnimetatust (Lisa 3).

3.2. Morfoloogiliste tunnuste analüüs

3.2.1. Peakomponentanalüüs ja diskriminantanalüüs

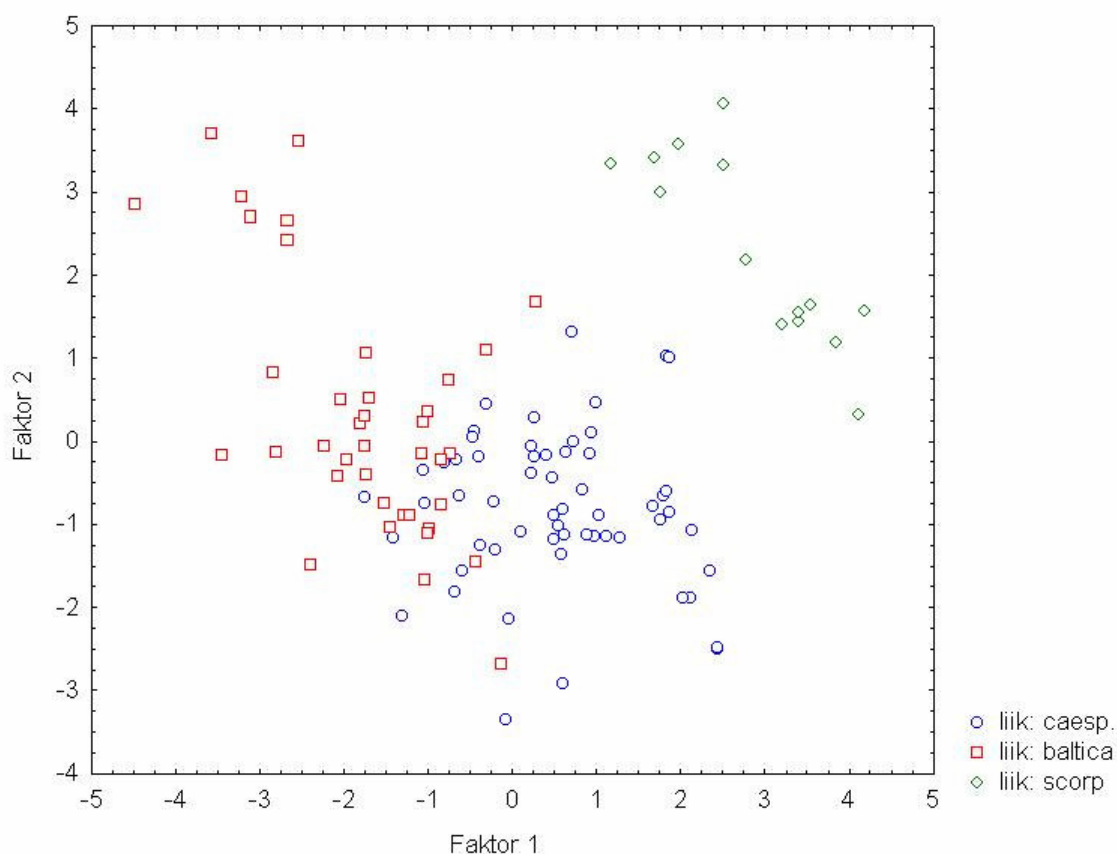
Kolme taksoni (*M. scorpioides*, *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa*) kohta tehtud peakomponentanalüüsi (Joonis 4) põhjal selgus, et *M. scorpioides* eristub ülejäänud kahest taksonist hästi. *M. laxa* ssp. *baltica* tüüpiliste isendite grupp osutus samuti eraldiseisvaks, ülejäänud taimed selle analüüsi alusel ei eristunud. Samuti eristus *M.*

scorpioides *M. laxa* alamliikidest diskriminantanalüüsi klassifikatsioonimaatriksi järgi 100%.

M. laxa kahe alamliigi puhul näitas diskriminantanalüüsi klassifikatsioonimaatriks mõnevõrra nõrgemat eristumist (Tabel 4).

Tabel 4. Diskriminantanalüüsi klassifikatsioonimaatriks *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* kohta. Ridades on vaatlustulemused, tulpades programmi poolt tunnustatud määrangud.

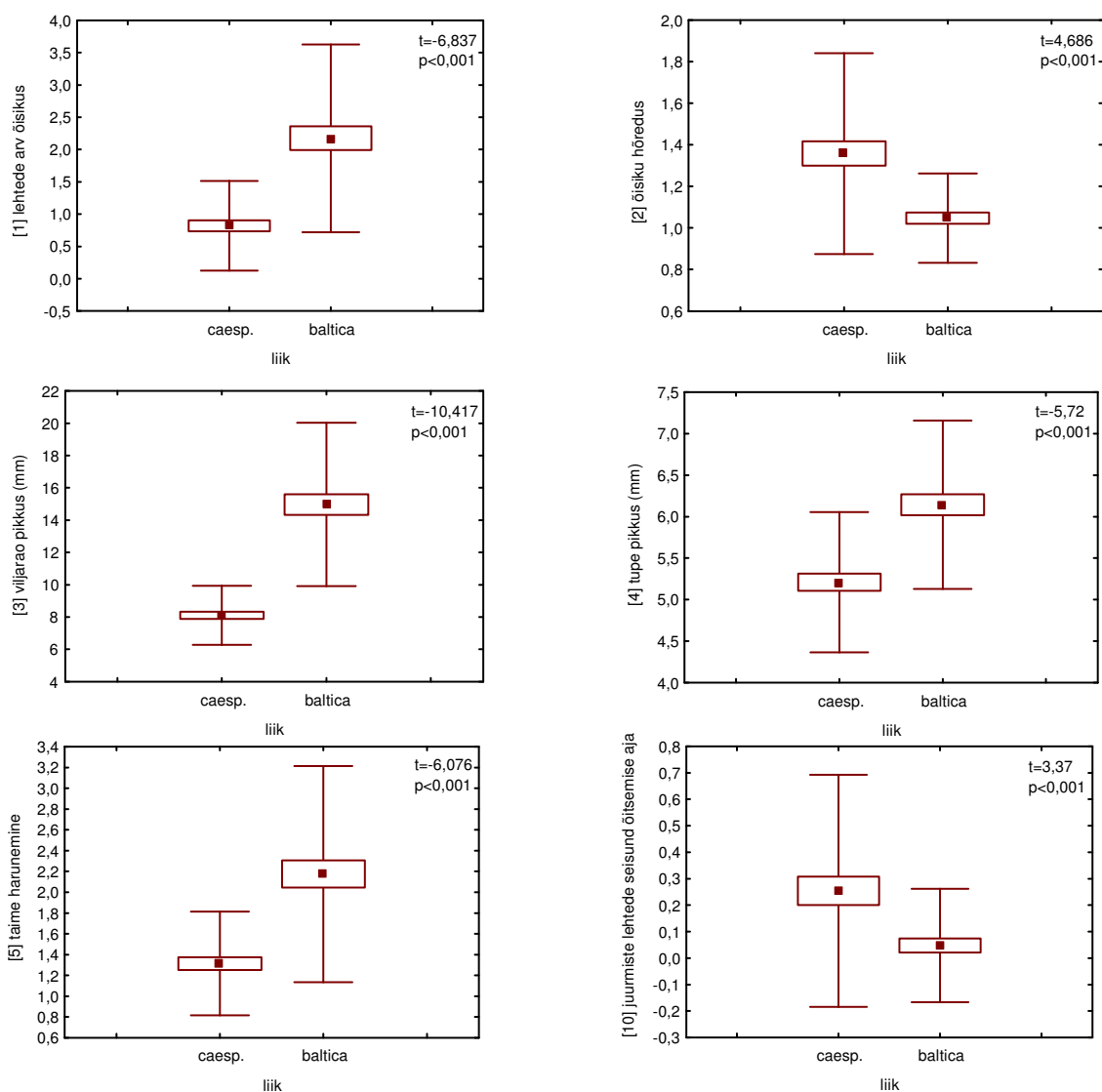
| takson | protsent | caesp. | baltica |
|---------|----------|--------|---------|
| caesp. | 85,71 | 54 | 9 |
| baltica | 96,55 | 2 | 56 |
| kokku | 90,90 | 56 | 65 |



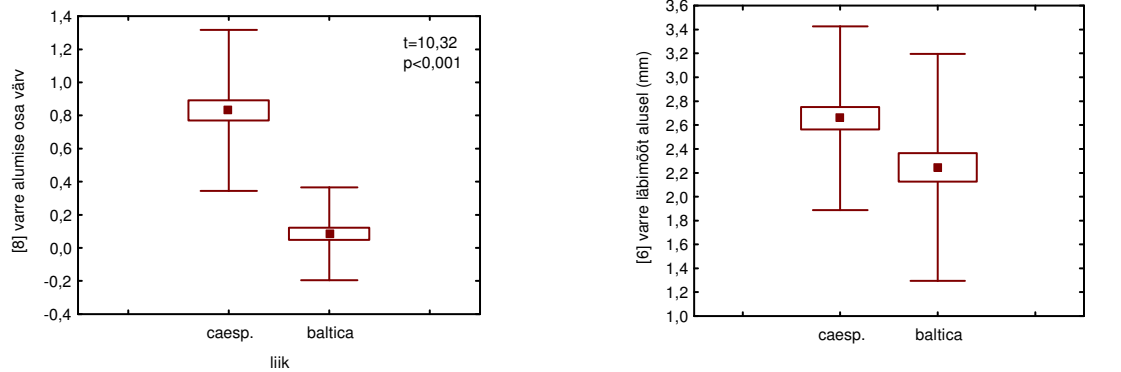
Joonis 4. Kolme taksoni (*M. laxa* ssp. *caespitosa*, *M. laxa* ssp. *baltica*, *M. scorpioides*) peakomponentanalüüs. Telje 1 omaväärtus on 3,00; kirjeldatud variatsioon 25,01%. Telje 2 omaväärtus on 2,27; kirjeldatud variatsioon 18,9%.

3.2.2. T-test

M. laxa ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* eristamistunnustest osutusid t-testi alusel statistiliselt oluliseks kaheksa tunnust (Joonis 5, Joonis 6). Olulised olid viljarao pikkus, tupe pikkus, varre alumise osa värv, õisiku hõredus, taime harunemise viis, lehtede arv õisikus, juurmiste lehtede seisund õitsemise ajal ja varre läbimõõt alusel (juurekaelal). Alamliikides kõige erinevamad olid viljarao pikkus ja varre alumise osa värvumine, kus variatsioon ei kattunud. Ülejäänud statistiliselt oluliste tunnuste puhul erinesid küll keskmised väärtused, kuid variatsioon kattus suuremal või vähemal määral.



Joonis 5. Statistiliselt oluliste eristamistunnuste keskmised väärtused, standardvead ja standardhälbed alamliikidel *caespitosa* ja *baltica*.



Joonis 6. Statistiliselt oluliste tunnuste keskmised väärtused , standardvead ja standardhälbed alamliikidel *caespitosa* ja *baltica*.

3.2.3. Hierarhiline dispersioonanalüüs

3.2.3.1. Alamliikide eristumine samas leiukohas

Tüüpiliste isendite populatsioonid erinevatest leiukohtadest (Joonis 7, populatsioon 3, Rohuküla ja Puulau leiukohad), eristusid kõigi analüüsitud tunnuste alusel hästi, välja arvatud juurmiste lehtede seisund, kus erinesid küll keskmised väärtused, kuid variatsioonid kattusid.

Kõige suuremad alamliikidevahelised erinevused olid varre alumise osa värvumises: selgelt eristusid alamliigid selle tunnuse alusel kolmes leiukohas (Jausa 2, Tiharu ja Sarve), kus alamliigid koos kasvasid. Täiesti sarnaselt olid erinevate alamliikide taimed värvunud kahes (Luidja 1 ning Lihula) ja mõnevõrra erinevalt Jausa 1 leiukohas.

Viljarao pikkuse alusel eristusid hästi eri alamliikide populatsioonid Jausa 1, Tiharu, ja Sarve leiukohtadest (Joonis 7). Variatsioonipiirid kattusid osaliselt Luidja 1 leiukohas ja langesid kokku Jausa 2 ja Lihula 2 leiukohas. Viljarao keskmine pikkus alamliikides oli kooskõlas määrajates antuga, jäädes alla 10 mm *ssp. caespitosa* puhul ja ulatudes üle 10 mm *ssp. baltica* puhul (vrld. ka Tabel 1).

Viljunud tupe pikkuse alusel eristusid alamliigid nõrgalt (Joonis 7). Viljunud tupe pikkuse variatsioonipiirid kattusid suures osas (Jausa 2, Tiharu, Luidja 1) või täielikult (Jausa 1, Lihula 2, Sarve). Võrreldes määrajates antud viljunud tupe pikkusega, on uuritud materjal erinev: uuritud populatsioonides on *ssp. caespitosa* viljunud tupe pikkus üle 5 mm, määrajate andmetel peaks see jääma alla 5 mm (vrld. ka Tabel 1).

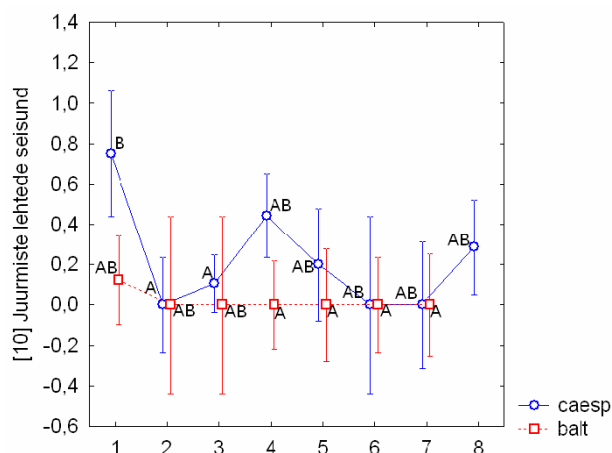
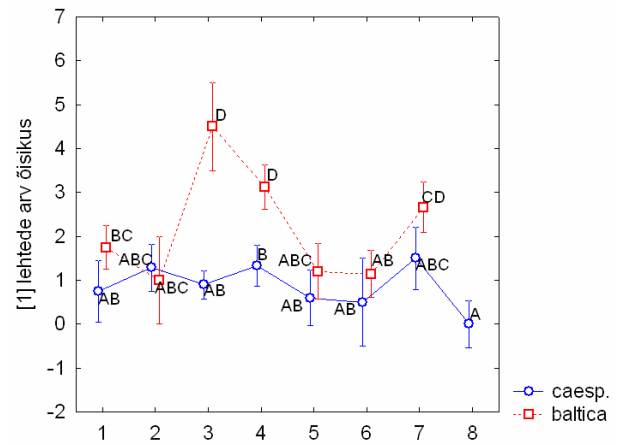
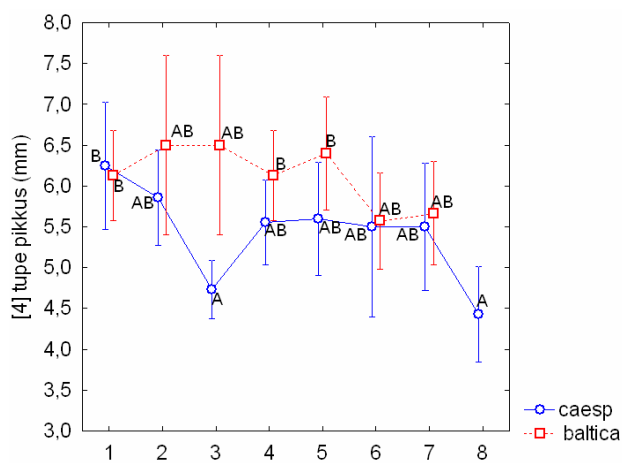
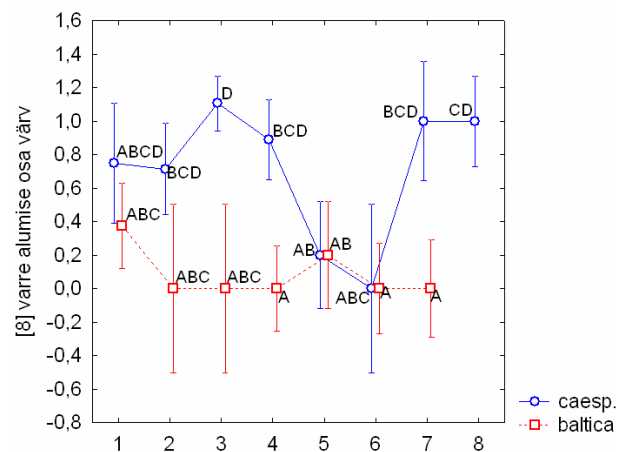
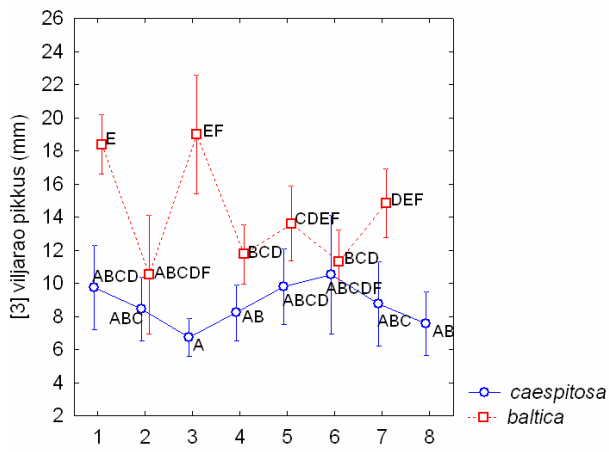
Õisikulehtede arvu alusel eristusid hästi populatsioonid Tiharu leiukohast, vähesel määral kattusid variatsioonipiirid leiukohtades Jausa 1 ja Sarve ning suures osas või täielikult Jausa 2, Luidja 1 ja Lihula leiukohas (Joonis 7).

Juurmiste lehtede seisundi taime õitsemise ajal oli alamliikides suhteliselt sarnane, lisaks olid erinevates leiukohtades kasvavad erinevate alamliikide taimed (nr. 3, joonis 7) selle tunnuse alusel võrdlemisi sarnased. Kahe leiukoha erinevate alamliigid erinesid selle tunnuse alusel (Jausa 1, Tiharu) ülejäänud olid sarnased.

3.2.3.2. Populatsioonide eristumine alamliikide sees

Alamliigi *baltica* sees erinesid populatsioonid kõige rohkem õisikulehtede arvu poolest ja suured erinevused olid ka viljarao pikkuses. Ülejäänud tunnuste osas olid populatsioonidevahelised erinevused väiksemad. Kõige sarnasemad olid ssp. *baltica* populatsioonid juurmiste lehtede õitsemisaegse seisundi poolest (viie populatsiooni taimedel olid juurmised lehed õitsemisajaks kuivanud ja vaid ühes oli isendeid, millel juurmised lehed olid õitsemisajal olemas). (Joonis7).

Alamliigi *caespitosa* populatsioonid olid sarnasemad kui alamliigi *baltica* populatsioonid. Kõige rohkem erinesid populatsioonid varre alumise osa värvi poolest.



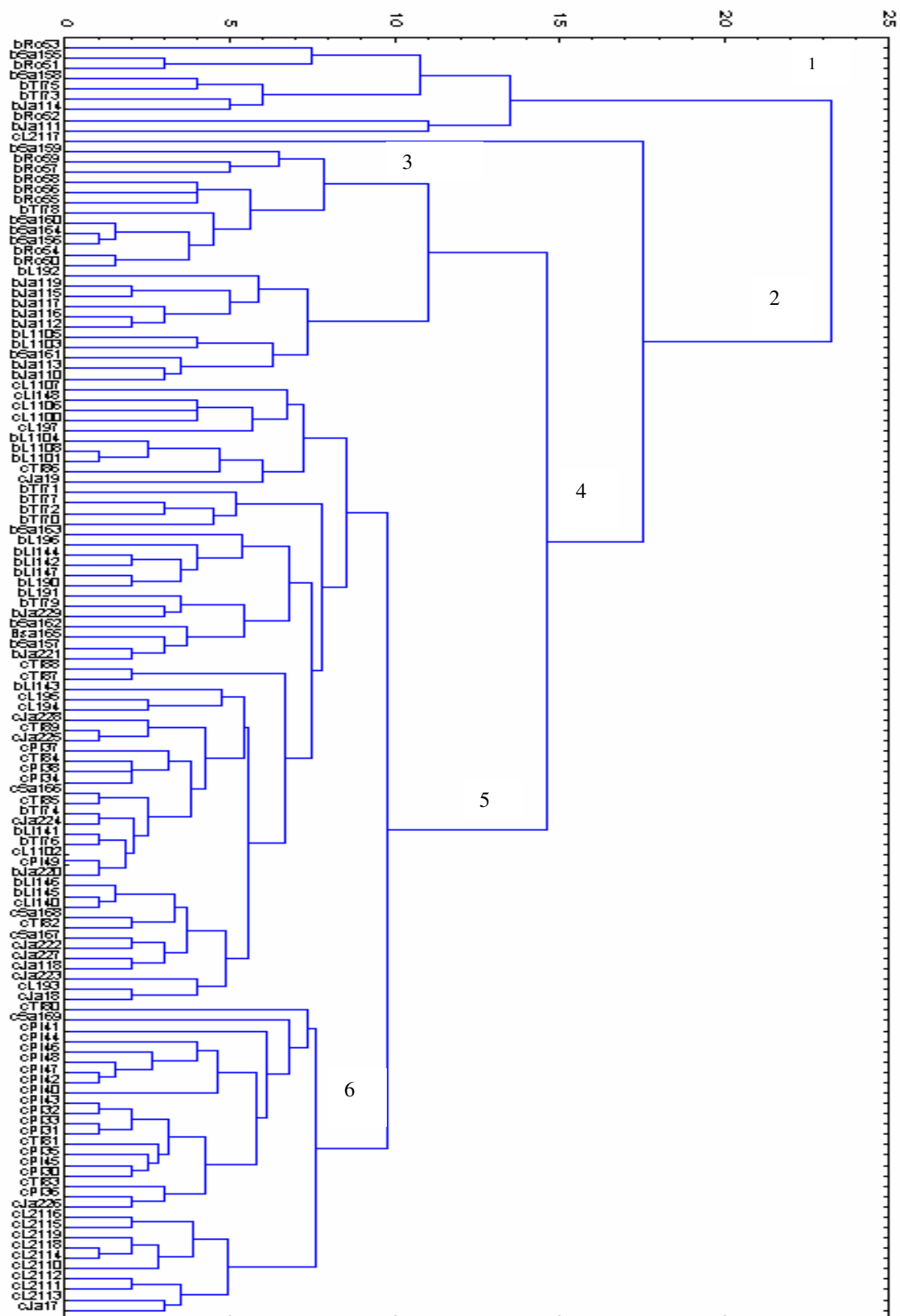
Joonis 7. Viljarao pikkuse, viljunud tupe pikkuse pikkuse, õisikus olevate lehtede arvu, varre alumise osa värvi ja juurmiste lehtede õitsemisaegse seisundi keskmised väärtused ja usalduspiirid ssp. *caespitosa* ja ssp. *baltica* populatsioonides leiukohtade kaupa. Leiukohad on numbritega tähistatud järgmiselt: 1 – Jausa I, 2 – Jausa II, 3 – Rohuküla (ssp. *baltica*) ja Puulaui (ssp. *caespitosa*), 4 - Tiharu, 5 – Luidja I, 6 – Lihula II, 7 - Sarve, 8 - Luidja II. Punktis 3 on tegemist kahe alamliigi tüüpiliste esindajatega erinevatest leiukohtadest. Tähtedega A, B, C, D, E, ja F on näidatud Tukey testi alusel keskmiste grupid, mis erinesid oluliselt.

3.2.4. Klasteranalüüs

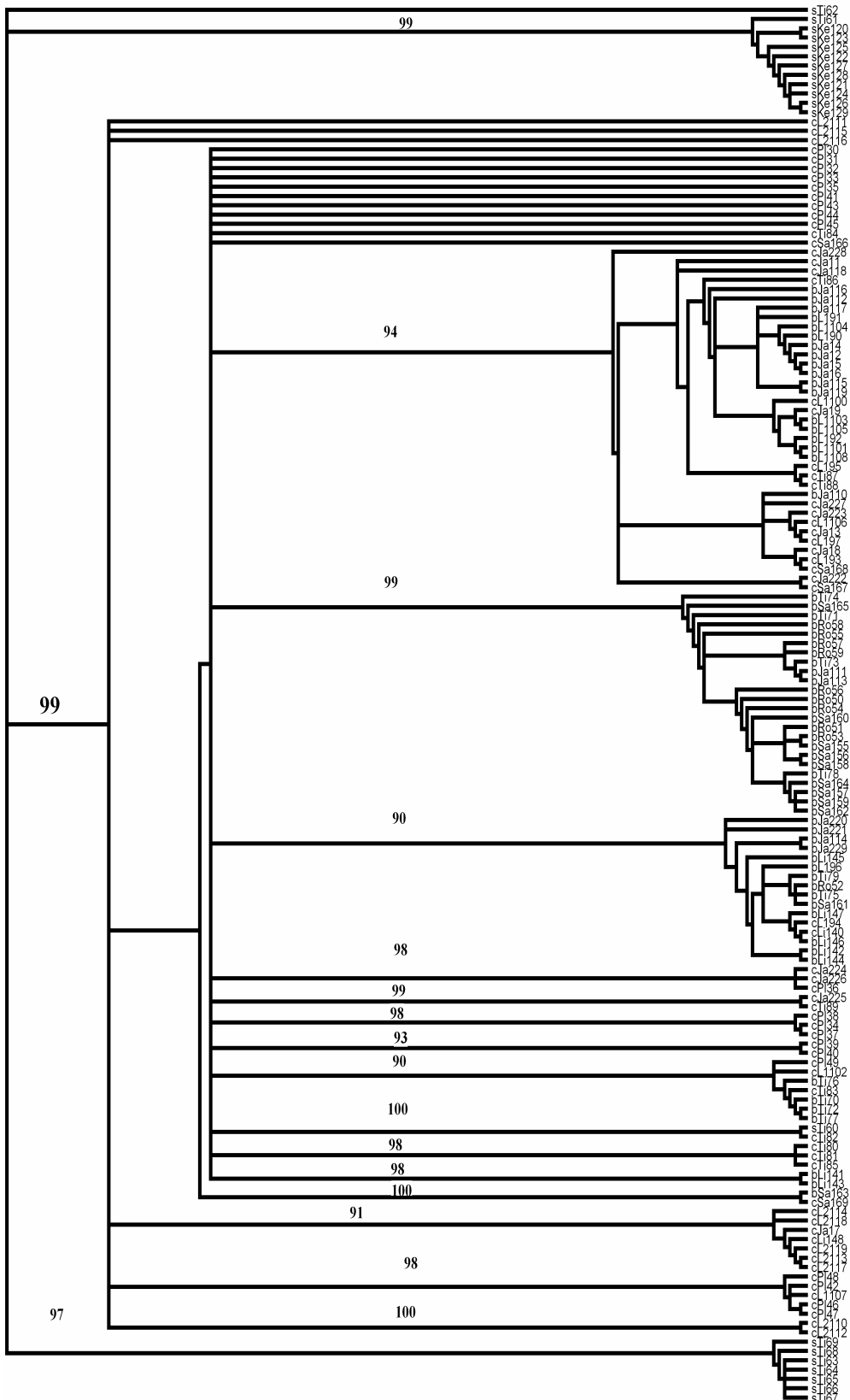
Klasteranalüüsiga (UPGMA, Manhattani kaugus) morfoloogiliste tunnuste põhjal koostatud dendrogrammil moodustasid tüüpilised ssp. *baltica* taimed ühe klatri (Joonis 8, klaster 3). Sellesse klastrisse kuulusid Sarve ja Rohuküla leiukohtade taimed, lisaks neli taime Tiharu leiukohast. Rohuküla leiukohas kasvasid ainult ssp. *baltica* taimed, Sarve leiukohas nii ssp. *baltica* kui ka ssp. *caespitosa* taimed ja Tiharu leiukohas ssp. *baltica*, ssp. *caespitosa* ja *M. scorpioides* taimed (vt. ka Lisa 3). Ühes klastris (Joonis 8, klaster 6) paiknesid vaid ssp. *caespitosa* taimed. Ülejäänud klastrites paiknesid ssp. *baltica* ja ssp. *caespitosa* läbiseigi. Väiksemates klastrites oli täheldatav ka mõningane leiukoha järgi rühmitumine.

3.2.5. Fülogeneesi analüüs

Morfoloogiliste tunnuste alusel tehti fülogeneesi analüüs 149 *M. scorpioides*, *M. laxa* ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica* isendi kohta. Kasutati 14 kodeeritud morfoloogilist tunnust (vt. 2.2.2. Andmete analüüs). Saadi 10000 alternatiivset fülogeneesipuud. Programmiga PAUP 4.0b8 konstrueeritud 50% enamusereegli konsensuspuul paiknesid *M. scorpioides* isendid *M. laxa* alamliikide isenditest eraldi, moodustades kolm lahendamata klaadi. Erinevate leiukohtade, Tiharu ja Keibu, *M. scorpioides* isendid paiknesid erinevatel harudel (ühe erandiga, Ti 62). Ülejäänud valim (*M. laxa* ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica*) osutus monofüleetiliseks rühmaks toetusega 99%. Fülogeneetilised suhted rühma sees olid *M. laxa* ssp. *caespitosa* suhtes enamasti lahendamata. *M. laxa* ssp. *baltica* isendid moodustasid kaks monofüleetilist rühma, millest ühes olid tüüpiliste morfoloogiliste tunnustega isendid Rohuküla ja Sarve leiukohtadest, koos nelja isendiga Tiharu leiukohast, toetus 99%. Teise rühma (toetus 90%) kuulusid *M. laxa* ssp. *baltica* isendid seitsmest erinevast leiukohast. Ülejäänud osas paiknesid *M. laxa* alamliigid läbiseigi, *M. laxa* ssp. *caespitosa* ei moodustanud omaette monofüleetilist rühma.



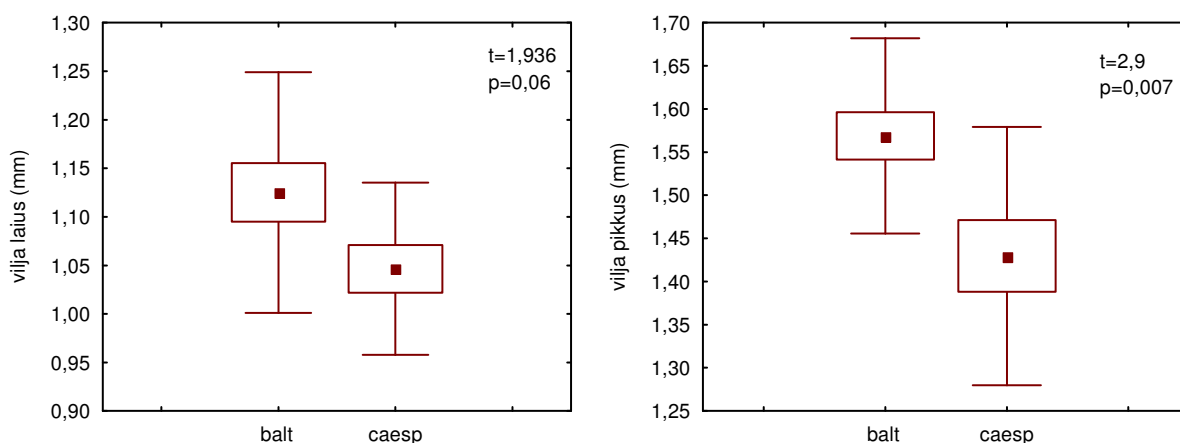
Joonis 8. Klasteranalüüsi dendrogramm (UPGMA, Manhattani kaugus) 127 *M. laxa* ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica* isendi kohta. Isendite koodid sisaldavad järgmist infot: 1) takson (*s-M. scorpioides*, *c-M. laxa* ssp. *baltica* ja *b-M. laxa* ssp. *baltica*); 2) leiukoht (Ti-Tiharu, Sa-Sarve, L1-Luidja 1, L2-Luidja 2, Li-Lihula, Pi-Puulau, Ja1-Jausa 1, Ja2-Jausa 2, Ro-Rohuküla, Ke-Keibu); 3) isendi number.



Joonis 9. 50% enamusreegli konsensuspuu kolme taksoni (*M. scorpiopides*, *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa*) 149 isendi parsimooniaanalüüsil saadud 10000 puu kohta morfoloogiliste tunnuste põhjal. Joonisel on näidatud suuremate harude kingapaelameetodil arvatud toetused. Isendite koodid on samad mis joonisel 8.

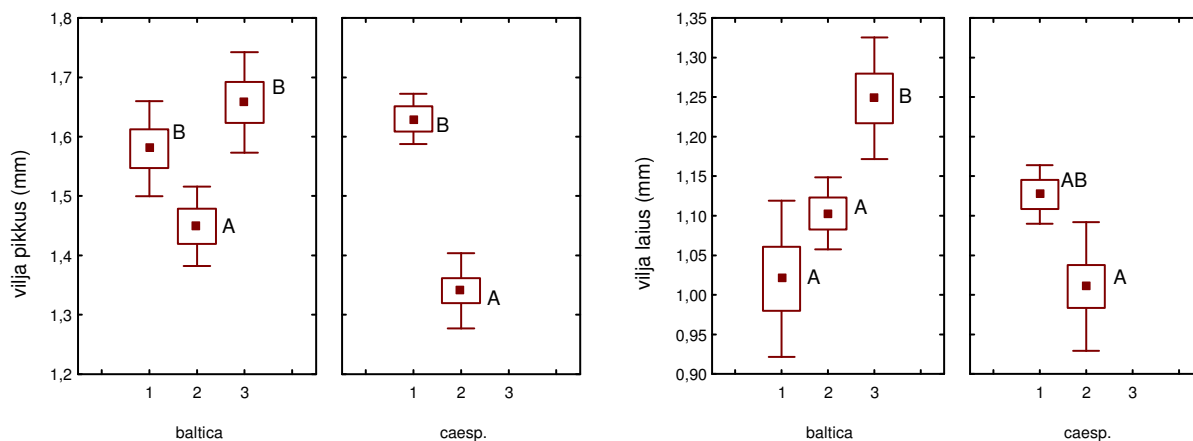
3.2.6. Viljade mõõtmed

Ssp. *baltica* viljad olid t-testi alusel keskmiselt pikemad ja laiemad kui ssp. *caespitosa* viljad (Joonis 10). Statistiliselt oluline oli vaid pikkuse erinevus ($p=0,007$). Tüüpiliste morfoloogiliste tunnustega ssp. *baltica* (populatsioon 3) viljad olid teiste ssp. *baltica* isendite viljadest veidi pikemad ja märgatavalt laiemad (Joonis 11). Ssp. *caespitosa* viljade mõõtmed olid kooskõlas varasemate andmetega, ssp. *baltica* viljad olid suhteliselt väikesed võrreldes määrajates antud mõõtmetega (Vrdl. ka Tabel 1).



Joonis 10. Viljade pikkuse ja laiuse keskmised väärtused alamliikides *baltica* ja *caespitosa*.

, standardvead ja standardhälbed



Joonis 11. Viljade pikkuse ja laiuse keskmised väärtused alamliikide *baltica* ja *caespitosa* erinevates populatsioonides (1- Tiharu, 2-Luidja, 3-Rohuküla). Tähtedega A ja B on näidatud Tukey testi alusel keskmiste grupid.

3.3. ITS-järjestuste analüüs

ITS-piirkond sekveneeriti 16 isendil (1 *M. arvensis*, 6 *M. laxa* ssp. *caespitosa*, 10 *M. laxa* ssp. *baltica* isendit). Järjestuste pikkus oli 630-684 bp. Heuristilise parsimooniaanalüüsiga leiti 269 lühimat puud. Kasutati 684 tunnust, millest 516 olid konstantsed, 84 mitteinformatiivsed ja 84 informatiivsed. (Alamliikide *M. laxa* ssp. *caespitosa* ja *M. laxa* ssp. *baltica* puhul eraldi oli 684 tunnusest 615 konstantsed, 51 mitteinformatiivsed ja 18 informatiivsed). Lühimate puude pikkus oli 269 sammu, CI=0,76; HI=0,24 ja RI=0,77. Iteratiivsel kaalumisel saadi lühimate puude pikkuseks 172 sammu, CI=0,92; HI=0,08 ja RI=0,91 (Joonis 12). Välisrühmaks määrati neli liiki (*M. cadmea*, *M. australis*, *M. verna* ja *M. discolor*), mis varasemal ITS-järjestustel põhineval perekond *Myosotis* evolutsioonipuul (Winkworth *et al.* 2002) paiknevad eraldi sellest harust, kus asub *M. laxa* ssp. *caespitosa*.

M. laxa s. t. moodustas monofüleetilise rühma, kuhu kuulus ka *M. rehsteineri* (Joonis 12). Edaspidi on seda rühma nimetatud *M. laxa* s. l. rühmaks. Ülejäänud perekonna *Myosotis* liigid olid sellest rühmast eraldi. *M. laxa* s. l. rühma sees eristus kolm väikesemat monofüleetilist alamrühma, mis olid moodustunud igäüks valdavalt ühe alamliigi isenditest, sisaldades siiski ka ühte või kahte isendit teisest alamliigist. Kaks isendit paiknesid eraldi harudel cSa167 ja bJa12 (Joonis 12). *M. rehsteineri* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* isendid, mille ITS-järjestused olid andmebaasist võetud, kuulusid samasse alamrühma koos kolme *M. laxa* ssp. *baltica* ja ühe *M. laxa* ssp. *caespitosa* isendiga (edaspidi *rehsteineri* rühm). Teine alamrühm koosnes neljast *M. laxa* ssp. *baltica* ja ühest *M. laxa* ssp. *caespitosa* isendist (edaspidi *baltica* rühm). Kolmandasse alamrühma kuulus neli *M. laxa* ssp. *caespitosa* isendit ja üks *M. laxa* ssp. *baltica* isend (edaspidi *caespitosa* rühm). Morfoloogiliste tunnuste alusel tüüpilised *M. laxa* ssp. *baltica* isendid (bRo50 ja bSa157) paiknesid erinevates alamrühmades. Leiukohtade alusel rühmitumine ei olnud täheldatav, kõik kolm alamrühma sisaldasid isendeid mitmest leiukohast. *M. arvensis* isend (arvLi134) moodustas monofüleetilise rühma andmebaasist pärineva *M. arvensis* isendiga. Nende rühmade kingapaelameetodil arvatud toetused olid järgmised: *rehsteineri* rühmal 65% , *baltica* rühmal 56% ja *caespitosa* rühmal 72%. (Joonis 12).

Välisrühmaks määratud neljast liigist eristus ülejäänud valim 100%. Kahest isendist koosnev *M. arvensis* rühm oli 100% toetusega ja oli sõsarrühmaks 75% toetusega rühmale, kuhu kuulus kolm erinevat *Myosotis* liiki ja *M. laxa* s. l. rühm.

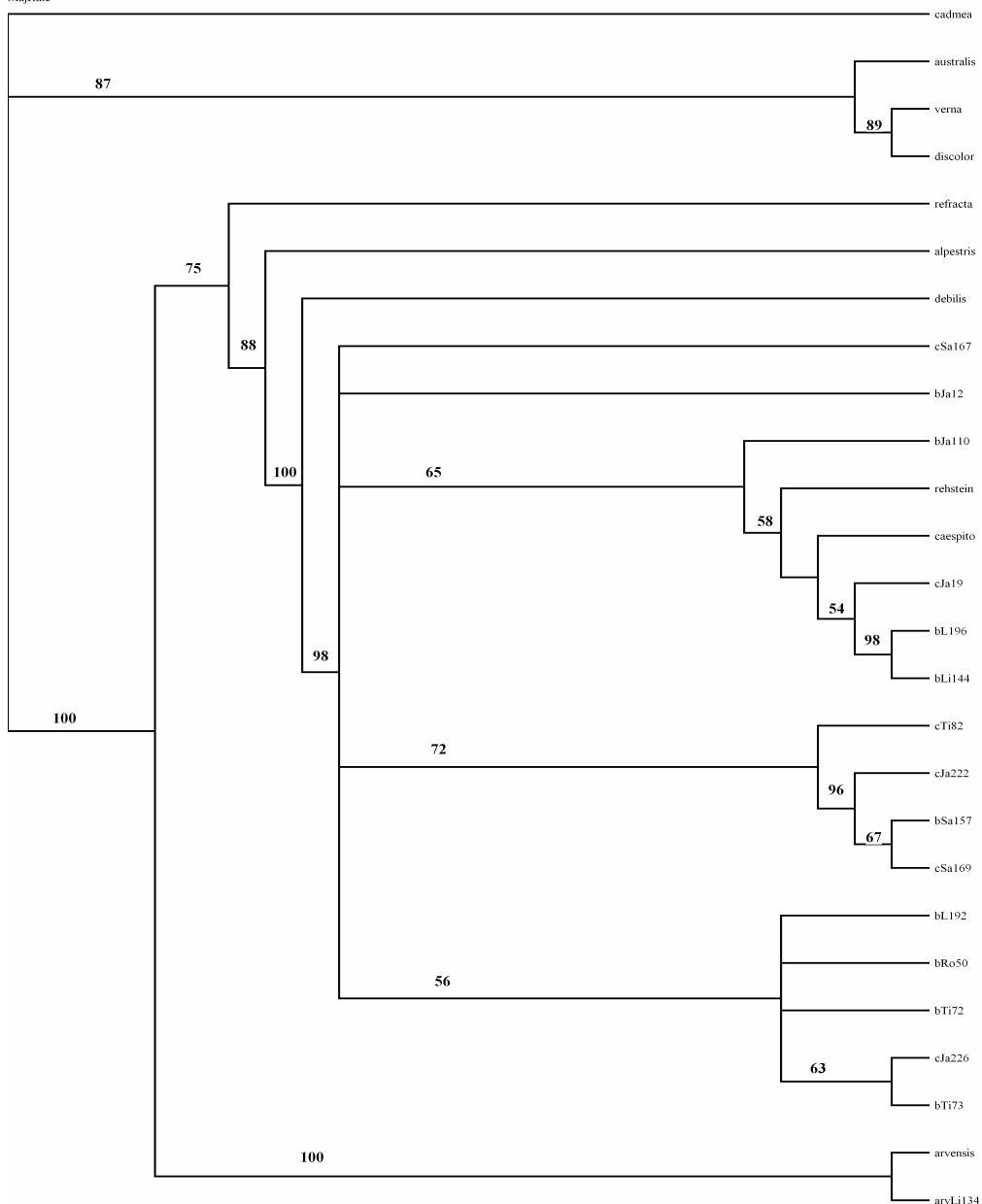
M. laxa s.l. rühma kingapaelameetodil arvatud toetus oli 98% , selle rühma sõsarrühmaks oli 100% toetusega *M. debilis*.

Lähimnaabri meetodil koostatud dendrogrammil (Joonis 14) oli *M. laxa s. l.* rühma struktuur sarnane selle rühma struktuuriga parsimooniaanalüüsiga saadud puudel. ITS-järjestuse alusel eristusid samasugused alamrühmad nagu parsimooniaanalüüsiski, oli täheldatav vaid üks erinevus *baltica* alamrühmas, kus isend bJa 12 ei ole ülejäänud rühmale sõsarrühmaks nagu parsimooniaanalüüsis (joonis 12, Joonis 13). *M. laxa s. l.* rühma sõsarrühmaks lähimnaabri meetodil koostatud puul on *M. debilis* sarnaselt parsimooniaanalüüsiga. Ülejäänud osas on puude erinevused suuremad: *M. refracta* ja *M. alpestris* on parsimooniaanalüüsi alusel *M. laxa s. l.* rühmale lähedasemad sugulased kui *M. arvensis*, kuid lähimnaabri meetodil on nad osutunud *M. laxa s. l.* rühmast erinevamaks kui *M. arvensis*.

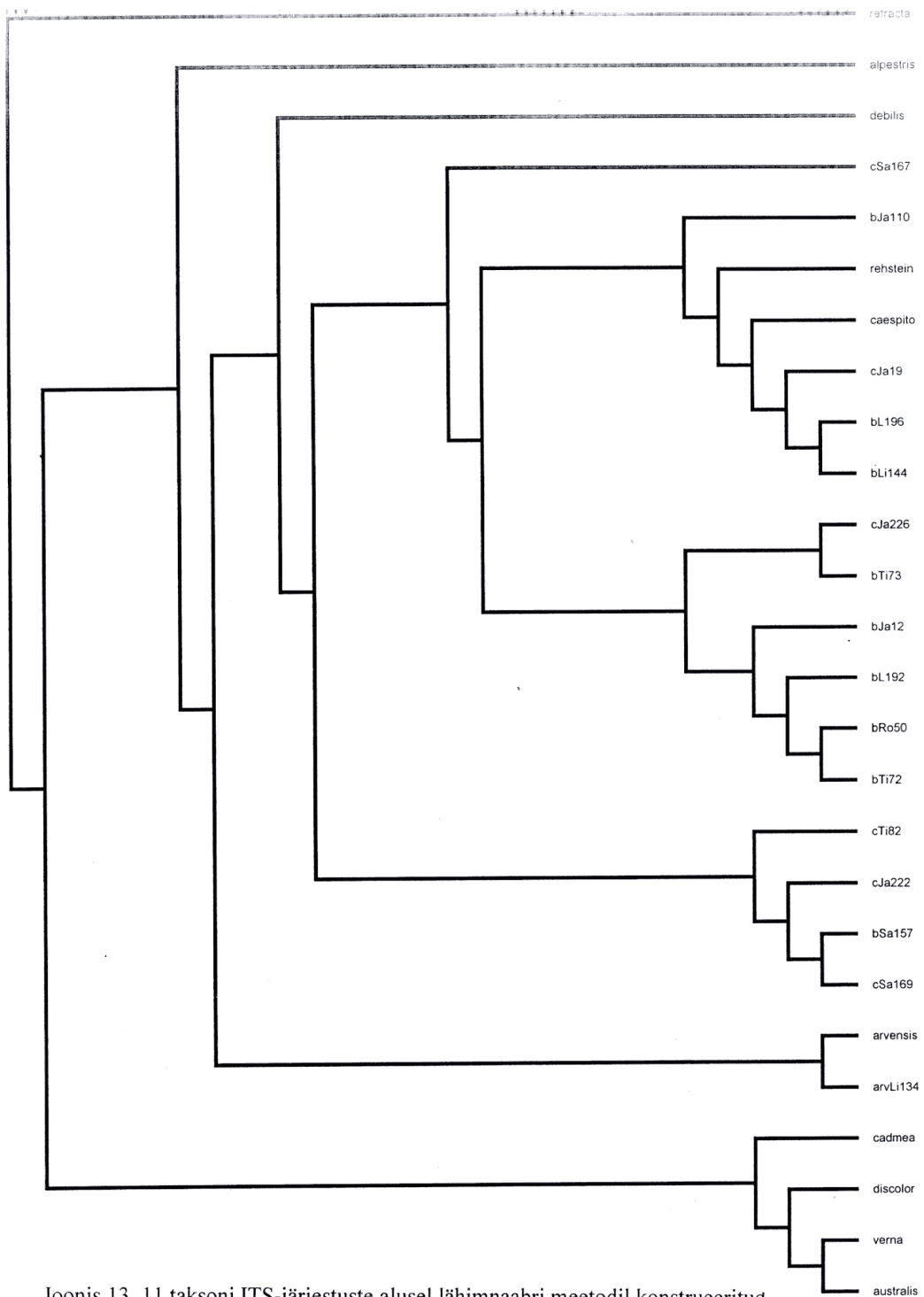
AMOVA analüüsil leitud geneetiline varieeruvus oli alamliikide *baltica* ja *caespitosa* sees väga suur ja alamliikide vahel väga väike $F_{st}=0,32$ (Tabel 5). Alamliikidevaheline geneetiline kaugus ei olnud statistiliselt oluline.

Tabel 5. Molekulaarse dispersioonanalüüsi (AMOVA) kokkuvõtte alamliikide ja populatsioonide analüüsil. ($F_{st}=0,036$, $p<0,001$). F_{st} olulisuse test põhines 1023 permutatsioonil.

| Variatsiooni allikas | Vabadusastmete arv | Ruutude summa | Variatsiooni komponendid | Variatsiooni protsent |
|----------------------|--------------------|---------------|--------------------------|-----------------------|
| Alamliikide vahel | 1 | 20,892 | 0,586 | 3,61 |
| Alamliikide sees | 17 | 266,845 | 15,697 | 96,39 |
| Kokku | 18 | 287,737 | 16,284 | 100,0 |



Joonis 12. 50% enamuseegli konsensuspuu 11 taksoni ITS-järjestuste parsimooniaanalüüsil saadud 269 lühima puu kohta. Puu pikkus on 172 sammu, CI=0,92; HI=0,08; RI=0,91. Analüüsis kasutati 684 tunnust, neist 516 olid konstantsed, varieeruvatest tunnustest olid 84 informatiivsed ja 84 mitteinformatiivsed. On näidatud kingapaelameetodil arvatud toetused üle 50%. Isendite koodid on samad mis joonisel 8. Täieliku või mittetäieliku liigiepiteediga on tähistatud andmebaasist pärinevad järjestused (vt. ka Tabel 3).



Joonis 13. 11 taksoni ITS-järjestuste alusel lähimnaabri meetodil konstrueeritud dendrogramm. Isendite koodid on nagu joonisel 8. Täieliku või mittetäieliku liigiepiteediga on tähistatud andmebaasist pärinevad järjestused (vt. ka Tabel 3).

3.4. Taimede kasvatamine

Stratifitseerimata *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* seemnetest idanesid vaid üksikud: 150 seemnest 4 (3 ssp. *caespitosa*, 1 ssp. *baltica*). Enamiku seemnete idanemisaeg peale 18-päevast stratifitseerimist oli umbes 1 ööpäev. Pikemat idanemisaega vajas 4% ssp. *baltica* ja 1% ssp. *caespitosa* seemnetest.

M. laxa ssp. *baltica* seemnete idanevusprotsendid populatsioonides varieerusid 44%-95%. Kõige madalam idanevusprotsent oli Rohuküla populatsiooni (tüüpilised ssp. *baltica* esindajad) seemnetel (44%). Ka olid selle populatsiooni kümnest idandist kolm elujõuetud. *M. laxa* ssp. *caespitosa* seemnete idanevus varieerus 68%-95%.

Idandi faas (seemne idanemisest pärislehtede tekkimiseni) oli 1-2 nädalat, selle ajaga arenes idanditel kuni 3 I järku külguurt. Arengukiiruses ssp. *caespitosa* ja ssp. *baltica* vahelist erinevust ei ilmnenu.

Generatiivsesse faasi jõudmiseks kulus taimedel 37-43 päeva. Stratifitseerimata idanenud neli isendit ei hakanud teistest varem õitsema, nende vegetatiivse faasi pikkus 64-68 päeva. Üheaastaseks osutus 47% ssp. *baltica* isenditest ja 38% ssp. *caespitosa* isenditest.

4. ARUTELU

Autentselt määratud herbaareksemplaride ja töö käigus kogutud ssp. *baltica* isendite tunnuste võrdlemine omavahel ja määrajates kirjeldatud tunnustega võimaldab väita, et tüüpiline ssp. *baltica* kasvab ka Eesti aladel ja esimesed tõendeksemplarid on kogutud 1932. aastal. Need asuvad TÜ BÖI Eesti Herbariumis (TU) ja on kogutud Virumaalt Kuusalust põhjas asuvalt mererannalt (Lisa 1).

M. laxa ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* statistiliselt olulisi eristamistunnuseid oli kaheksa (Joonis 5, Joonis 6). Nende hulgas oli ainult kaks tunnust, viljarao pikkus ja varre alumise osa värvumine, mille variatsioon ei kattunud ja mis seega peaks võimaldama kahte taksonit eristada. Viljarao pikkus on uuritavate taksonite tavaline eristamistunnus, varre alumise osa värvumist pole varem taimede määramisel kasutatud, kuid tema väärtus eristamistunnusena vajab täiendavat kontrollimist, kuna hierarhilise dispersioonanalüüsi põhjal (Joonis 7) võivad koos kasvavad eri alamliikide taimed olla ka sarnaselt värvunud.

M. laxa ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* eristuvad teineteisest morfoloogiliste tunnuste alusel selgelt vaid siis, kui on tegemist tüüpiliste isenditega (Joonis 7). Nii peakomponentanalüüs (Joonis 4) kui ka hierarhiline dispersioonanalüüs (Joonis 7) näitavad, et tüüpiliste isendite vahele jääb hulk vahevorme, mis eristuvad morfoloogiliste tunnuste alusel halvasti või ei eristugi. Samas näitab diskriminantanalüüsi klassifikatsioonimaatriks eristumist üle 80% (Tabel 4). Samuti on selge, et *M. laxa* ssp. *baltica* on varieeruvam kui *M. laxa* ssp. *caespitosa* (Joonis 4, Joonis 7).

Eriti sarnased on eri alamliikide taimed siis, kui kasvavad samas kasvukohas. Erandina võib siin välja tuua tunnuse "juurmiste lehtede seisund", mille alusel erinevates leiukohtades kasvavad erinevate alamliikide taimed olid võrdlemisi sarnased, kuid kolmes leiukohas koos kasvavad eri alamliikide taimed erinesid omavahel. Võib arvata, et seda tunnust mõjutavad peale taime pärilike omaduste ka kasvutingimused ja Puulau leiukohas oli liigniiskuse tõttu ssp. *caespitosa* taimedel leherosett hävinud. Tunnuste varieerumine alamliikide piires on külalt ulatuslik ja sageli on sama alamliigi erinevates kasvukohtades kasvavad taimed omavahel erinevamad kui eri alamliikide taimed samas kasvukohas. Sama järeldub ka klasteranalüüsi (Joonis 8) tulemusest – ühte klastrisse kuuluvad ainult ühe alamliigi isendid, kuid ülejäänud isendid (vahevormid) moodustavad klastreid, kus alamliigid paiknevad läbisegi. Kokkuvõttes võib öelda, et kasvukoht avaldab taime morfoloogilistele tunnustele suuremat mõju kui süstemaatiline kuuluvus. Samas ei rühmitu valim ka kasvukohtade alusel selgelt (Joonis 8).

Morfoloogiliste tunnuste alusel koostatud fülogeneesipuu põhjal (Joonis 9) saab teha järelduse, et *M. laxa s. l.* on tervikuna monofüleetiline, *M. laxa ssp. baltica* tüüpiliste morfoloogiliste tunnustega isendid moodustavad väiksema monofüleetilise rühma. *M. laxa ssp. caespitosa* eraldi on parafüleetiline ning fülogeneetilised suhted selle rühma sees on töös kasutatud morfoloogiliste tunnuste alusel jäänud osaliselt lahendamata.

Eelnevast järeldub, et ei ilmnenud selliseid morfoloogilisi tunnuseid, mille abil oleks võimalik alamliike üksteisest selgesti eristada. Samas eristub *M. laxa s. l.* valimist väiksem rühm taimi, mille morfoloogilised tunnused sobivad hästi *M. laxa ssp. baltica* kirjeldusega. Tulemus on sarnane varasemate uurimistulemustega (Apelgren 1990b) nende alamliikide kohta ja näitab, et *M. laxa s. l.* morfoloogiline variatsioon on Eesti aladel samasugune nagu Rootsis ja Soomes.

Viljade mõõtmetest, mida on ka *M. laxa ssp. caespitosa* ja *M. laxa ssp. baltica* eristamistunnustena kasutatud, osutus vaid vilja pikkus statistiliselt oluliseks eristamistunnuseks, kuid tunnuse variatsioon kattus suures osas (Joonis 10). Võrreldes viljade mõõtmeid erinevate alamliikide populatsioonides (Joonis 11), selgus, et Rohuküla leiukoha (tüüpiline *ssp. baltica*) taimede viljad on oluliselt laiemad kui kõigil teistel taimedel. Samas olid kõik töös uuritud *M. laxa ssp. baltica* viljad mõnevõrra väiksemad kui nad määrajate andmetel võiksid olla (vrld. ka Tabel 1). Võimalik, et viljad olid valmimata, seda toetab ka nende suhteliselt kehv idanemine ja osade idandite elujõuetus. Samas võisid Rohuküla leiukoha taimed, mis ülejäänud morfoloogiliste tunnuste poolest olid tüüpilised *M. laxa ssp. baltica* esindajad, olla lihtsalt vilja mõõtmete poolest ebatüüpilised.

Peakomponentanalüüsi (Joonis 4) ja diskriminantanalüüsi tulemused näitavad, et *M. scorpioides* eristub *M. laxa* alamliikidest selgelt. Samuti paiknevad *M. scorpioides* isendid eraldi *M. laxa s. l.* isenditest morfoloogiliste tunnuste alusel tehtud parsimooniaanalüüsi 90% enamuseegli konsensuspuul (Joonis 9). Võimalik, et *M. scorpioides* ei ole monofüleetiline, kuid sisaldab väiksemaid monofüleetilisi rühmi.

ITS-piirkonna järjestuse analüüsi tulemused (Joonis 12) näitavad, et *M. laxa s. l.* on monofüleetiline rühm (kingapaelameetodil arvatud toetus 98 %). Taksonid *M. laxa ssp. caespitosa* ja *M. laxa ssp. baltica* ei ole kumbki ITS-järjestuse alusel monofüleetilised. Morfoloogiliste tunnuste alusel koostatud fülogrammil (Joonis 9) kuulusid kaks tüüpiliste tunnustega *ssp. baltica* isendit bRo50 ja bSa157 ühte monofüleetilisse rühma, aga ITS-järjestuse alusel koostatud fülogrammis paiknesid need hoopis erinevates monofüleetilistes rühmades. Järelikult ei ole tüüpiliste tunnustega *M. laxa ssp. baltica* ITS-järjestuse alusel

monofüleetiline. *M. laxa s. l.* koosseisu kuulus nii parsimooniaanalüüsi fülogrammil kui ka lähimnaabri meetodil koostatud dendrogrammil (Joonis 13) *M. rehsteineri*, mis on varasemal perekond *Myosotis* evolutsioonipuul (Winkworth *et al.* 2002) *M. laxa ssp. caespitosa* sõsarrühmaks. Arvestades, et *rehsteineri* rühma (Joonis 12, Joonis 13) kuulus nii *ssp. caespitosa* kui ka *ssp. baltica* isendeid, võib arvata, et tegu on rühmale *M. laxa s. l.* ITS-järjestuse alusel väga sarnase taksoniga. *M. laxa s. l.* sõsarrühmaks oli nii parsimooniaanalüüsis kui ka lähimnaabri meetodil *M. debilis* (kingapaelameetodil arvatud toetus 100%), ja selline asukoht on sellel liigil ka varasemal perekond *Myosotis* evolutsioonipuul. *M. arvensis* isendid moodustavad monofüleetilise rühma (toetus 100%). Parsimooniaanalüüsi alusel (Joonis 12) ei ole *M. arvensis* *M. laxa s. l.* rühmale lähim sugulane, kuid lähimnaabri meetodi alusel (Joonis 13) on ta *M. laxa s. l.-M. debilis* rühmale kõige sarnasem rühm.

AMOVA alusel osutus alamliigisisene ITS-piirkonna varieeruvus alamliikidevahelisest suuremaks (Tabel 5), järelkult ei eristu alamliigid ITS-järjestuse alusel teineteisest.

Arvestades suure varieeruvusega ITS-piirkonna sarnasust uuritavatel taksonitel, tundub kahtlane, et *M. laxa ssp. baltica* on Ahvenamaa saarestikus tekkinud ja sealt laiali levinud endeem (Apelgren 1991). Eeldades, et *M. laxa ssp. caespitosa* on Eesti aladel kohalik liik ja *M. laxa ssp. baltica* saabunud siia hiljem, võiks nende taksonite ITS-piirkonnad olla erinevad, või vähemalt selge erinevus rühmade vahel näha olla. Pigem võiks *M. laxa ssp. baltica* lugeda ökotüübiks, mis on tekkinud ja tekib Läänemere piirkonna erinevates osades korduvalt, sõltuvalt looduslikest tingimustest. Esinemissageduse vähenemine oletatavast tekketsentrist eemal (ka Eesti aladel) võib olla tingitud vaid looduslike tingimuste erinevusest: väiksem maakerge võrreldes Ahvenamaa ja Botnia lahe piirkonnaga tagab vähem muutlikud elutingimused vegetatsiooniperioodil, seega kujuneb ka kohastumusi muutlikele elutingimustele harva välja. Samas, kui elutingimused on tõepoolest muutlikud, on ka kõrgem risk üksikute populatsioonide hukkumiseks, mis omakorda võib tingida selle taksoni harva esinemise.

Seemnete idandamisel ja taimede kasvatamisel selgus, et stratifitseerimata seemned valdavalt ei idane ning peale kahenädalast stratifitseerimist idanes enamik seemneid.

Rohuküla populatsiooni taimed (tüüpiline *ssp. baltica*), idanesid ja arenesid kõige halvemini. Kuna nende taimede viljad olid vaid veidi suuremad *ssp. caespitosa* viljadest ning polnud saavutanud maksimaalset suurust (vt. ka Tabel 1), võib arvata, et nad olid valmimata.

Generatiivsesse faasi jõudsid laboris kasvatatud taimed kiiremini võrreldes Apelgreni (1986, 1991) andmetega, kus ssp. *baltica* hakkab õitsema kuus nädalat pärast külvi ja ssp. *caespitosa* umbes kaks nädalat hiljem. Võimalik, et taimed arenesid kiiremini (37-43 päeva, ssp. *baltica* varasemat õitsemist ei täheldatud) tänu soodsatele kasvutingimustele, samas ei selgu Apelgreni (1986, 1991) töödest, kas taimi kasvatati laboris või välitingimustes. Ssp. *baltica* ja ssp. *caespitosa* sarnane arengukiirus on vastuolus varasemate andmetega.

Üheaastaseks osutus veidi rohkem ssp. *baltica* järglasi kui ssp. *caespitosa* puhul. Tiheda leheroseti moodustamine on ssp. *baltica* puhul ebatüüpiline ning viitab, et ssp. *baltica* võib olla ka leherosetina talvituv. Samas võib Harperi (1977) andmetel ka monokarpne taim peale õitsemist ellu jääda (sureb umbes 12 kuu jooksul peale õitsemist). Võimalik seletus kõrvalekalletele oodatavast elutsüklist on labori tingimuste erinevine looduslikest tingimustest; taimi kasvatati lihtsalt pika päeva tingimustes, imiteerimata päeva pikkuse muutumist kasvuperioodi jooksul (Vt. ka. "Materjal ja meetodika"). Saamaks teada, kas *M. laxa* ssp. *baltica* võib olla talvituv monokarpne või polükarpne, on vajalikud täiendavad uuringud. Tulemustest järeldub, et uuritud taimede elutsükkel on sarnane ja alamliike selle järgi eristada pole võimalik.

Võib arvata, et *Myosotis baltica* nime kandvasse taksonisse kuulub tegelikult *Myosotis laxa* mererandades kasvav ökotüüp, mille iseloomulikud tunnused on kohastumused muutlikele kasvutingimustele.

KOKKUVÕTE

Myosotis laxa ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* kuuluvad sugukonda *Boraginaceae* (karelehelised), seltsi *Solanales* (maavitsalaadsed), mitteformaalsesse rühma pärisasteriidid I (*Euasterids I*). Sugukonna koht pärisasteriidide I rühmas pole täpselt määratletud (APG II 2003) ja sugukonnasiseste rühmade fülogenees ei ole selge (Judd *et al.* 2002). Alamliiki *M. laxa* ssp. *baltica* on varasemates töodes käsitletud kui Läänemere regiooni mikroendeemi, mis on tekkinud Ahvenamaa ja Botnia lahe rannaladel. Eestis on *Myosotis laxa* ssp. *baltica* harvaesinev (Viljasoo 1969, Lazdauskaite *et al.* 1996, Kukk 2004). Töodes, mis käsitlevad taimestiku kujunemist Ahvenamaa saarestikus (Palmgren 1927, 1961) ja lõosilma perekonna süstemaatikat (Apelgren 1990b, 1991), on väidetud, et *M. laxa* ssp. *baltica* Eestis ei esine. *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* eristamine üksteisest morfoloogiliste tunnuste alusel on keeruline, kuna esineb palju kahe alamliigi vahepealsete tunnustega isendeid. Molekulaarsete meetoditega on varem uuritud perekonna *Myosotis* Uus-Meremaal kasvavaid liike, sealhulgas ka liiki *M. laxa* ssp. *caespitosa*. *M. laxa* ssp. *baltica* ITS-järjestust pole varem uuritud.

M. laxa ssp. *baltica* 72 (sh *M. baltica* Sam., *M. laxa* Lehm.) herbaareksemplari (TAA, TU) läbivaatamisel selgus, et vanim Eestist pärinev tüüpiliste tunnustega herbaareksemplar on kogutud 1932. aastal Virumaalt Kuusalust ja see asub TÜ BÖI Eesti Herbaariumis (TU). Välitööde käigus koguti 15 populatsioonist 159 taime, millel mõõdeti 14 morfoloogilist tunnust ja võeti leheproov DNA eraldamiseks.

Morfoloogilisi tunnuseid analüüsiti dispersioon- ja diskriminantanalüüsiga ja tehti fülogeneesianalüüs. Selgus, et ei ole "head" morfoloogilist tunnust või tunnuste gruppi, mis võimaldaks alamliike kindlalt eristada, kuid kogu valimist eristub grupp *M. laxa* ssp. *baltica* taimi, mis kannavad tüübi kirjeldusele vastavaid tunnuseid. Valim ei rühmitunud selgelt ka leiukohtade alusel. Morfoloogiliste tunnuste alusel tehtud fülogeneesianalüüs näitas, et *M. laxa* s. l. tervikuna on monofüleetiline ning *M. laxa* ssp. *baltica* tüüpiliste tunnustega isendid moodustavad väiksema monofüleetilise rühma. Sekvenceritud 16 ITS-järjestuse alusel tehti molekulaarse variatsiooni analüüs ja fülogeneesi analüüs. *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa* vaheline geneetiline kaugus ei olnud statistiliselt oluline ning geneetiline varieeruvus oli alamliikide sees suurem kui alamliikide vahel, järelikult ei eristu need alamliigid ITS järjestuste alusel. Fülogeneesianalüüs näitas, et *M. laxa* s. l. on ITS-järjestuste alusel monofüleetiline.

Mõlema alamliigi taimede laboris kasvatamisel selgus, et kumbki alamliik võib olla nii üheaastane kui ka talvituv.

Arvestades seda, et alamliigid ei erine oluliselt morfoloogiliste ega molekulaarsete tunnuste alusel, võib arvata, *Myosotis laxa* ssp. *baltica* nime kandvasse taksonisse kuulub tegelikult *Myosotis caespitosa* mererandades kasvav ökotüüp, mille iseloomulikud tunnused on kohastumused muutlikele kasvutingimustele.

Tänuavaldused

Suur tänu juhendajatele Silvia Pihule ja Ülle Reierile teadusliku suunamise eest kogu tööprotsessi jooksul. Aitäh Maarja Öpikule asjalike nõuannete eest laboratoorse töö ja molekulaarsete andmete analüüsi osas, samuti Irja Saarele abi eest sekveneerimisel. Laboratoorset tööd rahastas Eesti Teadusfond (grant 5815). Palju tänu Botaanika ja Ökoloogia Instituudi töötajatele sõbraliku, toetava ja teaduslikult arendava töökeskkonna eest. Suurimad tänusõnad minu abikaasale Neeme Koogile ja ülejäänud perekonnale igakülgse abi, toetuse ning mõistva suhtumise eest minu õpingute jooksul.

ABSTRACT

Myosotis laxa ssp. *baltica* and *M. laxa* ssp. *caespitosa* belong to the family *Boraginaceae*, to the order *Solanales*, to the non formal group *Euasterids* I. The position of the family among the *Euasterids* I has not been specified (Judd *et al.* 2002, APG II 2003) and the phylogenesis of the groups in the family is still not clear. *M. laxa* ssp. *baltica* has been treated as a microendemic of the Baltic region that has evolved in the coastal regions of the Åland Islands and Gulf of Bothnia and it has still been considered as not occurring in Estonia. The distinction between *M. laxa* ssp. *baltica* and *M. laxa* ssp. *caespitosa* on the basis of morphological characteristics is difficult, because of the wide range of variability. The species of the family *Myosotis* originating in New Zealand have been studied earlier using molecular methods, including the ITS sequence of *M. laxa* ssp. *caespitosa*, but ITS sequence of *M. laxa* ssp. *baltica* has not still been examined.

The aims of the present research are:

1. To analyse the value of the morphological characteristics in distinction of *M. laxa* ssp. *caespitosa* and *M. laxa* ssp. *baltica* .
2. To find out if the endemic taxon *M. laxa* ssp. *baltica* occurs in Estonia.
3. To check up whether the species of the genus *Myosotis* ser. *Palustres* can be distinguished on the base of the ITS sequence.
4. To make clear the relationship of the *M. laxa* ssp. *caespitosa* and *M. laxa* ssp. *baltica* on the bases of ITS sequence.

Based on a study the herbarium of the Institute of Agricultural and Environmental Sciences (Estonian Agricultural University) (TAA) and the herbarium of Institute of Botany and Ecology (Tartu University) (TU), it became evident that the oldest typical specimen *M. laxa* ssp. *baltica* was collected at Kuusalu in Virumaa in 1932 and is preserved in the herbarium of Institute of Botany and Ecology of Tartu University (TU).

During the field works (2002-2003) 159 plants from taxa *M. laxa* ssp. *caespitosa*, *M. laxa* ssp. *baltica*, *M. scorpioides* and *M. arvensis* were collected. The 15 morphological characteristics of the collected plants were examined and the DNA samples were taken. The morphological characteristics were analysed using variation and discriminant analysis and phylogenetical analysis was carried out. Based on the ITS sequences of 16 plants (*M. laxa* ssp. *caespitosa*, *M. laxa* ssp. *baltica* and *M. arvensis*), the analysis of molecular variance and the phylogenetical analysis were made.

The conclusion of morphological study is that a very efficient morphological characteristic or group of characteristics to distinguish *M. laxa* ssp. *caespitosa* and *M. laxa* ssp. *baltica* does not exist. A group of plants was different from the other sample and was carrying the characteristics according to the type description of *M. laxa* ssp. *baltica*.

The phylogenetic analyses made on the basis of morphological characteristics, showed that *M. laxa* s. l. is monophyletic and typical specimens of *M. laxa* ssp. *baltica* form a clade.

The study of ITS sequences point out that the genetical distance between the *M. laxa* ssp. *baltica* and *M. laxa* ssp. *caespitosa* was not statistically significant. Therefore these taxa can not be distinguished on the basis of ITS sequence. The analyses of phylogenesis based on ITS sequences showed that *M. laxa* s. l. is monophyletic.

Growing the two taxa in the laboratory show out that both *M. laxa* ssp. *caespitosa* and *M. laxa* ssp. *baltica* may be annual or biennial.

Similarity in the different characteristics between the subspecies allows conclude that the taxon *Myosotis baltica* probably is a coastal ecotype of *Myosotis caespitosa*. It is growing in the coastal areas and is adapted to its instable, fluctuating conditions.

KIRJANDUS

1. Alvarez, I., Wendel, J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.
2. Apeltgren, K., 1986. Nagra problematiska *Myosotis*-arter vid Östersjön. *Svensk Bot. Tidskr.* 80: 145-150.
3. Apeltgren, K., 1990a. *Myosotis baltica* – a questionable taxon. *Sommerfeltia* 11: 5-11 Oslo.
4. Apeltgren, K. 1990b. Variation and distribution of *Myosotis laxa* sensu lato (Boraginaceae) in the Baltic region. *Annales Botanici Fennici* 27: 287-299.
5. Apeltgren, K. 1991. Relations between coast and inland taxa in the Baltic region: case studies in *Galium palustre* s. lat. and *Myosotis laxa* s. lat. *Acta Universitatis Upsaliensis* 306: 20-26.
6. APG II 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. of the Linnean Society* 141: 399-436.
7. Bailey, C. D., Carr, T. G., Harris, S. A., Hughes, C. E., 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 435-455.
8. Baskin, C. C., Baskin, J. M., 1998. *Seeds. Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination.* p 212. Academic Press, San Diego.
9. Cepurīte, B., 2003. Vascular flora of Latvia: *Boraginaceae* (Borage family), *Verbenaceae* (Vervain family), pp 32-33. Riga: University of Latvia.
10. Doyle, J. J., Doyle, J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
11. Ericson, L., Wallentinus, H.-G., 1979. Sea-shore vegetation around the Gulf of Bothnia. *Guide for the International Society for Vegetation Science July-August 1977.* *Wahlenbergia* 5: 1-142.
12. Grau, J., Merxmüller, H. 1972. *Myosotis* L. In: Tutin, T.G., Heywood, V. H., Burges, N.A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A (eds.) *In: Flora Europea III*, pp. 111-117. Cambridge University Press, Cambridge.
13. Grau, J., Schwab, A., 1982. Mikromerkmale der blüte zur Gliederung der Gattung *Myosotis*. *Mitt. Bot. München* 18, 9-58.

14. Hall, T., A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.
15. Harper, J. L., 1977. Population biology of plants, pp. 664-670. Academic Press, London.
16. Hershkovitz, M. A., Zimmer E. A., Hahn, W. J., 1999. Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics. In: Hollingsworth, P. M., Bateman, R. M., Gornall, R. J., (eds.) Molecular Systematics and Plant Evolution, pp. 268-326. Taylor & Francis, London.
17. Hilger, H.H., Selvi, F., Papini, A., Bigazzi, M. 2004. Molecular Systematics of *Boraginaceae* tribe *Boragineae* based on ITS 1 and trnL sequences, with special reference to *Anchusa* s.l. Annals of Botany 94 (2): 201-212.
18. Hultén, E., Fries, M., 1986. Atlas of North European vascular plants II, p. 780, 1559, 1560. Fuldaer Verlagsanstalt GmbH, Fulda.
19. Ingelög, T., Andersson, R., Tjernberg, M. (eds.) 1993. Red data Book of the Baltic Region. Swedish Threatened Species Unit, Uppsala.
20. Jonsell, B. 1988. Mikroendemism i det baltiska landhöjningsområdet. Blyttia 46: 65-73.
21. Judd, W. S., Campbell C. S, Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. 2002. Plant Systematics: A phylogenetic approach, Second Edition, pp.115-117. Sinauer Associates Inc, Sunderland.
22. Kukk, T., 1999. Eesti taimestik, lk. 132-133. Teaduste Akadeemia Kirjastus, Tartu-Tallinn.
23. Kupffer, K. R., 1925. Grundzüge der Pflanzengeographie des ostbaltischen Gebietes. Abhandlungen des Herder-Instituts zu Riga, Bd 1.
24. Långström, E., 2002. Systematics of *Echiochilon* and *Ogastemma* (*Boraginaceae*), and the phylogeny of *Boraginoideae*. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
25. Lazdauskaite, Z., Viljasoo, L., Cepurite, B., 1996. *Myosotis* L. In: Kuusk, V., Tabaka, L., Lekavicius, A (eds.) Flora of the Baltic Countries, pp. 280-282. Eesti Loodusfoto AS, Tartu.
26. Lid, J., Lid, D. T., 1994. *Myosotis* L., minneblom, forglemmegei. In: Norsk Flora pp. 492-494. Det Norske Samlaget, Oslo.
27. Lindberg, H., 1915. *M. laxa* Lehm. en misskänd art af *Myosotis palustris*-gruppen. Societas pro Fauna et Flora Fennica 41: 70-77.

28. Lindberg, H., 1933. *Myosotis laxa* Lehm. (*M. baltica* Samuelss.). Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica 10: 94-96.
29. Nikiforova, O. D., 2001. System of the genus *Myosotis*. Botanicheskii Zhurnal St.Petersburg 86 (12): 77-86.
30. Palmén, E., 1930. Untersuchungen über die Strömungen in den Finnland umgebenden Meeren. Soc. Scient. Fennica Comment Phys.-Mathem. 5: 1-94. (ref. Apelgren 1990).
31. Palmgren, A., 1927. Die Einwanderungswege der Flora nach den Alandsinseln. Acta Botanica Fennica 2:1-198.
32. Palmgren, A., 1961. Studier över havsstrandens vegetation och flora på Åland. Acta Botanica Fennica 61:1-268.
33. Ploompuu, T., 1995. Harjumaa klindieelsete saarte soontaimed. In: LUS-I aastaraamat 76. kd. lk. 17-49. TA Kirjastus, Tallinn.
34. Przyvara, L., 1986/87. Biosystematic studies on the series *Palustres* M. Pop. of the genus *Myosotis* L. from Poland. Fragmenta Floristica et Geobotanica 31-32 (1,2) pp. 77-116.
35. Rebassoo, H.-E., 1960. Hiiumaa laidude taimkattest. In: LUS-i aastaraamat, 53 kd, lk. 95-112. TA Kirjastus, Tallinn.
36. Rebassoo, H.-E., 1997. Matsalu RLK saarte kõrgemate taimede floora nimestik. In: Loodusevaatlusi 1995/1996, lk. 98, Tallinn.
37. Reier, Ü., 1999. Perekond Lõosilm – *Myosotis* L. In: Leht, M. (ed) Eesti taimede määraja, lk. 229-231. Eesti Loodusfoto, Tartu.
38. Samuelsson, G., 1926. *Myosotis baltica*. In: Lindman, C.A.M., Svensk fanerogamflora, ed. 2., p. 458. Nordstedt, Stockholm.
39. Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. 2000. ARLEQUIN ver. 2.000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Switzerland.
40. Schuster, R. 1967. Taxonomische Untersuchungen über die Serie *Palustres* M. Pop. der Gattung *Myosotis* L. Feddes Repert. 74: 39-98.
41. StatSoft Inc. 2001: STATISTICA (data analysis software system), version 6. --- www.statsoft.com.
42. Stenberg, L., Mossberg, B., Ericsson, S. 1992. Den nordiska floran, pp. 368-370. Wahlström & Widstrand, Turnhout.
43. Swofford, D., L. 1998. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

44. Tzvelev, N. N. 2000. *Myosotis* L. In: Manual of the vascular plants of North-West Russia. pp. 546-549. St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy Press, St.Petersburg (In Russian).
45. Ulvinen, T. 1998. Boraginaceae – lemmikkikasvit. In: Hämet-Ahti, L., Suominen, J., Ulvinen, T., Uotila, P. (eds), *Retkeilykasvio*, pp. 352-354. Luonnontieteellinen keskusmuseo, Kasvimuseo, Helsinki
46. Uotila, P. & Pellinen, K. 1985. Chromosome numbers in vascular plants from Finland. *Acta bot. Fennica* 130.
47. Viljasoo, L., 1969. Perekond lõosilm e. meelislill – *Myosotis* L. In: Eichwald, K., Eilart, J., Kalda, A., Kask, M., Paivel, A., Talts, S., Viljasoo, L. (eds) *Eesti NSV Floora*, IV kd, lk. 489-510. Valgus, Tallinn.
48. Vissak, P., 1991. *Matsalu Riikliku Looduskaitseala taimeistik*. Matsalu Riikliku Looduskaitseala väljaanne, Valgus, Tallinn.
49. Weller, S. G., 1985. Establishment of *Lithospermum caroliniense* on sand dunes: The role of nutlet mass. *Ecology* 65, 1893-1901.
50. White, T. J., Burns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp 315-322.
51. Winkworth, R. C., Grau, J., Robertson, A. W., Lockhart, P. J., 2002. The origins and evolution of the genus *Myosotis* L (Boraginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24: 180-193.
52. Yuan, Y. M., Song, Y., Geuten, K., Rahelivololona, E., Wohlhauser, S., Fischer, E., Smets, E., Kúpfer, P., 2004. Phylogeny and biogeography of *Balsaminaceae* inferred from ITS sequences. *Taxon*, 53 (2) pp. 391-403.

KÄSIKIRJAD

1. Mägi, M., 1997. Hiiumaa laidude (Hanikatsi, Saarnaki) taimekoosluste ökoloogiline analüüs. Lisa 9. 318. Tartu. Magistritöö. Käsikiri asub Tartu Ülikooli Botaanika ja Ökoloogia Instituudis.

ANDMEBAASID

1.GenBank,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=Nucleotide,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=Nucleotide)

13.05.2005.

2. Eesti soontaimede levikatlase andmebaas EPMÜ Põllumajandus- ja Keskkonnainstituudis (PKI) 03.03.2005.

LISAD

**Lisa 1. *Myosotis laxa* ssp. *baltica* herbaareksemplarid erinevates herbaariumides.
Lühendid: Saa – Saaremaa, Vi – Virumaa, Hi – Hiiumaa, Pää – Pärnumaa, Lää – Läänemaa, Ha – Harjumaa, LääVi – Lääne-Virumaa.**

| Herbaarium | <i>M. laxa</i> ssp. <i>baltica</i> (sh. <i>M. baltica</i> , <i>M. laxa</i> ,) herbaarlehtede arv | Sh. tüüpiliste tunnustega herbaareksemplare | | |
|---------------------------------|--|---|--|---|
| | | arv | dateeringud | leiukohad |
| TÜ BÖI Eesti Herbaarium | 16 | 6 | 1933 1934? 1937? 1932 | Saa.Anseküla; Kõverlaid Vi, Kuusalu |
| TÜ BÖI Herbarium Generale | 2 | 1 | 1924 | Soome, Turu, Latosaari |
| EPMÜ PKI Herbaarium | 54 | 14 | 1956 1967 1993 1981 1971 1960 1957 1957 1960 1958 2000 1975 | Hi, Tahkuna ps, Mudaste ja Kauste vahel; Pää, Heinlaid Tõstamaa lähedal; Vormsi, Hullost 1,5 km S; Lää, Keibu lahe äärest oja kaldalt; Hi, Kõrgelaid; Lää, Keedikalt 2-3 km N Hi, Anikatsi laid Hi, Vareselaid Ha, Väike-Pakri Hi, Kadaka- e. Vasikalaid Lää, Puise LääVi Lahemaa, Lobineem. |

Lisa 2. Tööks kogutud *M. laxa* ssp. *caespitosa*, *M. laxa* ssp. *baltica*, *M. scorpioides* ja *M. arvensis* isendite leiukohad (vt. ka Lisa 3, Lisa 4)



Lisa 3. Kasvukohtade ja taimede kirjeldused

1. Jausa 1, Hiiumaa. Käina-Emmaste maantee ääres Jausa oja lammil. Suhteliselt hõre taimestik (*Caltha palustris*, *Iris pseudacorus*). Niiske pinnas, ilmselt periooditi üleujutatav. *M. laxa* ssp. *caespitosa*, *M. laxa* ssp. *baltica* kasvasid läbisegi.
2. Jausa 2, Käina-Emmaste maantee 3. kilomeetril maateekraavi põhjal. Suhteliselt kuiv pinnas. Ssp. *caespitosa* ja ssp. *baltica* läbisegi.
3. Puulaiu, Hiiumaa. Kassari poolsaare lääneservas Nasva-Orjaku tee 1. kilomeetril tee ääres soisel alal (roostiku serv). Ssp. *caespitosa*.
4. Rohuküla, Läänemaa. Rohuküla sadamast umbes 700m põhja suunas veepiiril. (*Phragmites australis*, *Galium uliginosum*) Tüüpiline ssp. *baltica* – taimed väiksed, alumine viljaraag pikk (tupp sellel raol samuti pikk), õisik lehistunud, juurmised lehed õitsemisajaks kuivanud.
5. Tiharu, Hiiumaa. Madal soine rand (*Phragmites australis*, *Galium uliginosum*). 3 taksoni esindajad ühes leiukohas, aga mitte päris läbisegi: oja kaldal *M. scorpioides*, rohkem ojas *M. laxa* ssp. *baltica*, eemal kuivemas kohas *M. laxa* ssp. *caespitosa*.
6. Luidja 1, Hiiumaa. Luidja lepikus lompide ja oja kaldal. Pinnas väga niiske, ümbritsev taimestik hõre. Ssp. *baltica* ja ssp. *caespitosa* läbisegi.
7. Luidja 2, Hiiumaa. Luidja oja kaldal ja ojas rannaluidete piirkonnas. Tüüpiline ssp. *caespitosa*.
8. Keibu, Läänemaa. Keibust umbes 1km piki randa Nõva poole, ojas märjal liival. Palju mitteõitsevaid *M. scorpioides* kodarikke, osa ka iseloomulike suurte õitega.
9. Lihula 1, Läänemaa. Lihula linnast 1 km idas põldudevahelise tee serval. Kuiv pinnas. *Myosotis arvensis*.
10. Lihula 2, Läänemaa. Lihula raba piirava kraavi põhjal (niiske pinnas), vaatetorni lähedal. Põhiliselt ssp. *baltica*, ka ssp. *caespitosa*. Ebatüüpiline kasvukoht rannikutaime jaoks.
11. Sarve, Hiiumaa. Sarve poolsaare idarannal, umbes 1,5 km Heltermaa sadamast. Kahe taksoni (ssp. *caespitosa* ja ssp. *baltica*) esindajad tihedas kogumikus läbisegi veepiiril, ümbritsev taimestik hõre. Mõlema alamliigi tüüpilised esindajad, ka vahepealsete tunnustega taimed.

Lisa 4. Erinevatest leiukohtadest kogutud isendite arv (vt. ka Lisa 2, Lisa 3)

| Leiukoht | <i>M. laxa</i> ssp. <i>baltica</i> | <i>M. laxa</i> ssp. <i>caespitosa</i> | <i>M.</i> <i>scorpioides</i> | <i>M.</i> <i>arvensis</i> |
|----------------|---------------------------------------|--|---------------------------------|------------------------------|
| Jausa 1 | 13 | 6 | 0 | 0 |
| Jausa 2 | 3 | 7 | 0 | 0 |
| Puulaiu | 0 | 20 | 0 | 0 |
| Tiharu | 10 | 10 | 10 | 0 |
| Luidja 1 | 9 | 8 | 0 | 0 |
| Luidja 2 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| Sarve | 11 | 4 | 0 | 0 |
| Rohuküla | 10 | 0 | 0 | 0 |
| Lihula | 0 | 0 | 0 | 10 |
| Lihula | 7 | 2 | 0 | 0 |
| Keibu | 0 | 0 | 10 | 0 |
| Kokku isendeid | 63 | 67 | 20 | 10 |

Lisa 5.**Viljade mõõtmete keskmised väärtused, standardvead ja 95% usalduspiirid alamliikidel *M. laxa* ssp. *baltica* ja *M. laxa* ssp. *caespitosa***

| Alamliik | Isendite arv | Viljade arv | Vilja keskmine pikkus (mm) | Usalduspiir -95,0% | Usalduspiir +95,0% | Standardhälve | Vilja keskmine laius (mm) | Usalduspiir -95,0% | Usalduspiir +95,0% | Standardhälve |
|----------|--------------|-------------|----------------------------|--------------------|--------------------|---------------|---------------------------|--------------------|--------------------|---------------|
| Balt | 17 | 78 | 1,57 | 1,51 | 1,63 | 0,11 | 1,13 | 1,06 | 1,19 | 0,12 |
| Cae | 13 | 72 | 1,43 | 1,34 | 1,52 | 0,15 | 1,05 | 0,99 | 1,10 | 0,09 |
| kokku | 30 | 150 | 1,50 | 1,45 | 1,56 | 0,15 | 1,09 | 1,05 | 1,13 | 0,12 |

Lisa 6.

Viljade mõõtmete keskmised väärtused, standardvead ja 95% usalduspiirid alamliikide *M. laxa ssp. baltica* ja *M. laxa ssp. caespitosa* erinevates leiukohtades. Leiukohad on tabelis tähistatud järgmiselt: 1 - Tiharu, 2 – Luidja, 3 – Rohuküla.

| Alamliik | Isendite arv | Viljade arv | Leiukoht | Vilja keskmine pikk. (mm) | Usalduspiir -95,0% | Usalduspiir +95,0% | Standardviga | Standardhälve | Vilja keskmine laius (mm) | Usalduspiir -95,0% | Usalduspiir +95,0% | Standardviga | Standardhälve |
|----------|--------------|-------------|----------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------|---------------|
| Balt | 6 | 27 | 1 | 1,58 | 1,50 | 1,66 | 0,03 | 0,08 | 1,02 | 0,92 | 1,12 | 0,04 | 0,10 |
| Balt | 5 | 30 | 2 | 1,45 | 1,37 | 1,53 | 0,03 | 0,07 | 1,10 | 1,05 | 1,16 | 0,02 | 0,05 |
| Balt | 6 | 21 | 3 | 1,66 | 1,57 | 1,75 | 0,03 | 0,08 | 1,25 | 1,17 | 1,33 | 0,03 | 0,08 |
| Cae | 4 | 22 | 1 | 1,63 | 1,56 | 1,70 | 0,02 | 0,04 | 1,13 | 1,07 | 1,19 | 0,02 | 0,04 |
| Cae | 9 | 50 | 2 | 1,34 | 1,29 | 1,39 | 0,02 | 0,06 | 1,01 | 0,95 | 1,07 | 0,03 | 0,08 |
| kokku | 30 | 150 | | 1,51 | 1,45 | 1,56 | 0,03 | 0,15 | 1,09 | 1,04 | 1,13 | 0,02 | 0,12 |