

Tartu Ülikool
Bioloogia-geograafiateaduskond
Botaanika ja ökoloogia instituut

Tiina Talve

**Saaremaa robirohu (*Rhinanthus osiliensis*) geneetiline
mitmekesisus ja taksonoomia**

Magistritöö

Juhendajad: vanemteadur Tatjana Oja

teadur Silvia Pihu

Tartu 2007

Sisukord

Sisukord	2
1. Sissejuhatus.....	3
1.1 Perekonna <i>Rhinanthus</i> L. üldiseloomustus	4
1.2 Eestis levinud robirohuliigid.....	5
1.3 Saaremaa robirohu <i>Rhinanthus osiliensis</i> üldiseloomustus	8
1.3.1 Saaremaa robirohu morfoloogia ja võrdlus rumeelia robirohuga	8
1.3.2 Liikide bioloogia	12
1.3.3 Liikide levik ja ökoloogia	12
2. Endeemsete liikide geneetiline varieeruvus.....	14
3. Töö eesmärgid.....	15
4. Materjal ja meetodika	15
4.1 Välitööde meetodika	15
4.2 Isoensüümanalüüs	18
4.2.1 Ensüümekstraktide valmistamine ja polüakrüülamiid - geelelektroforeesi (PAGE) geelide koostised.....	19
4.2.2 Ensüümogrammide ilmutamine	21
5. Andmete analüüs.....	23
6. Tulemused.....	24
7. Arutelu	33
Kokkuvõte.....	38
Summary	39
Kasutatud kirjandus	41
Lisad.....	48

1. Sissejuhatus

Botaanikud on alati huvitunud haruldastest ja endeemsetest taimeliikidest. Viimasel ajal on see huvi aina kasvanud, sest paljude elusorganismide väljasuremise oht aina suureneb. Eriti drastiline on oht haruldaste ja endeemsete liikide puhul. Seetõttu on haruldaste liikide geneetiline mitmekesisus aktuaalne uurimisteema.

Perekond *Rhinanthus* L. (sugukond *Orobanchaceae*) on ligikaudu 100 liigiga polümorfne perekond. Liikidel eristatakse hooajalise varieeruvuse tõttu veel erinevaid ökotüüpe (Soo 1929; Soo & Webb 1972). Lisaks sellele on liikide morfoloogilised tunnused varieeruvad ja osaliselt kattuvad ning seetõttu puudub liikide piiritlemisel üksmeel. Kesk-Euroopas eristatakse arvukalt kitsalt piiritletud liike, samas Põhja-Euroopas käsitletakse robirohu liike laiemas mahus.

Saaremaa robirohi *Rhinanthus osiliensis* (Ronniger et Saarsoo) Vass. on Eesti endeem, kasvades ainult Saaremaal Viidumäe looduskaitseala allikasoodes ja selle lähiümbruses. Võrreldes teiste selle perekonna laialt levinud liikidega pakub liigi *R. osiliensis* geneetiline mitmekesisus suurt huvi.

Haruldaste liikide populatsioonid on enamasti väikesed ja isoleeritud ning see takistab nendevahelist geenisiiret, mis põhjustab suhteliselt madalat geneetilist mitmekesisust (Karron 1991; Glover & Abbott 1995; Max *et al.* 1999). Kuid see ei tähenda veel, et liikide üldine geneetiline varieeruvus on alati väike. Arvukad tööd (Gitzendanner & Soltis 2000; Dodd & Helenurm 2002; Park 2004) on näidanud, et haruldaste liikide geneetilist mitmekesisust on oluline võrrelda samasse perekonda kuuluvate laialt levinud lähedaste liikidega. Nimelt, ühise fülogeneesi alusel on ühe perekonna liikidel ajalooliselt hilisem ühine eellane, kui eri perekondade liikidel. Perekonnasisesed liikide erinevused on sõltumatud teistest perekondadest. Gitzendanner ja Soltis (2000) leidsid, et haruldaste liikide üldine geneetilise mitmekesisuse tase on tihti võrreldav sama perekonna laialt levinud liikidega. Populatsioonidesisene ja – vaheline geneetiline varieeruvus jaguneb sarnaselt nii haruldastel kui sama perekonna laialt levinud liikidel. Haruldastel liikidel on siiski märgatud mõne parameetri (nt. polümorfsete lookuste protsent (P), keskmine alleelide arv lookuse kohta (A), vaadeldud heterosügootsus (H_o)) madalamad väärtused. On juhtumeid (Chung 1995; Gitzendanner

& Soltis 2000), kus haruldaste liikide geneetiline varieeruvus on samal või isegi kõrgemal tasemel sama perekonna laialt levinud liikidega.

Geneetilise mitmekesisuse säilitamine on oluline liikide ellujäämisel, sest varieeruvuse vähenemine piirab populatsiooni kohastumist muutuvates keskkonnatingimustes (Menges 1990).

Haruldaste ja endeemsete liikide geneetilist mitmekesisust on võimalik tuvastada erinevate molekulaargeneetiliste meetoditega. DNA uurimismeetodite kõrval kasutatakse endiselt laialdaselt elektroforeetilist isoensüümanalüüsi (Park 2004; Helenurm *et al.* 2005, Oja & Paal 2007). Isoensüümanalüüs on sobilik looduslike liikide esmaseks uurimiseks, sest nende kohta pole molekulaargeneetilisi andmeid ja seega ei saa kasutada spetsiifilisi praimereid nõudvaid DNA meetodeid. Paljud tööd (Dodd & Helenurm 2002; Park 2004; Ohkawa *et al.* 2006; Oja 1999, 2002, 2005) on näidanud, et isoensüümid kui kodominantsed (s.t. homo- ja heterosügoote eristavad) markerid, sobivad lähedaste liikide geneetilise mitmekesisuse iseloomustamiseks ning fülogeneetiliste seoste ja taksonoomia uurimiseks.

Antud töös uuritakse isoensüümtunnuste alusel endeemse liigi *R. osiliensis* geneetilist mitmekesisust ja seda võrreldakse sama perekonna laialt levinud liigiga *R. rumelicus*.

1.1 Perekonna *Rhinanthus* L. üldiseloomustus

Perekonnas *Rhinanthus* L. on ligikaudu 100 poolparasiitset robirohu liiki, mille põhilevilad on üle Euroopa (Kask 1969; Soo & Webb 1972; Ter Borg 2005).

Robirohud on üheaastased ja ühekojalised putuktolmlejad (Kwak 1978; Böhme 2001). Perekonna liigid on fakultatiivsed juure-poolparasiidid. Haustorite abil imevad nad peremeestaime juurest vett ning mineraalaineid. Peremeestaime puudumisel on nad võimelised ka iseseisvalt kasvama (Kask 1969; Ter Borg 2005).

Perekonda on erinevates floorades iseloomustatud järgnevalt (Kask 1969; Soo & Wedd 1972; Ivanina 1981). Vastakud lehed on saagja- või täkilishambulised servaga.

Kaheli õiekattega õied on mõlemasugulised ja moodustavad koos kõrglehtedega kobarjaid õisikuid. Taimedel eristatakse varre- ja vahelehti ehk interkalaarlehti, viimased paiknevad ülemise harudepaari ja õisikualuse vahel. Õietupp on nelja tipmega, peaaegu kilejas, paljas või karvane, mõningatel juhtudel näarmekarvane. Viljumisel on tupp põisjalt puhetunud. Kollane õiekroon on iseloomulikult kahehuuleline. Kaks lühemat tolmuat on suletud krooni putkesse ja kaks pikemat tolmuat ulatuvad sellest välja. Avanev kupar sisaldab endas väikseid tiivulise servaga seemneid.

Morfoloogiliste tunnuste suure varieeruvuse tõttu on perekonna liikide määramine keeruline ja erinevad uurijad käsitlevad liike erinevas mahus (Soo 1929; Soo & Webb 1972).

1.2 Eestis levinud robirohuliigid

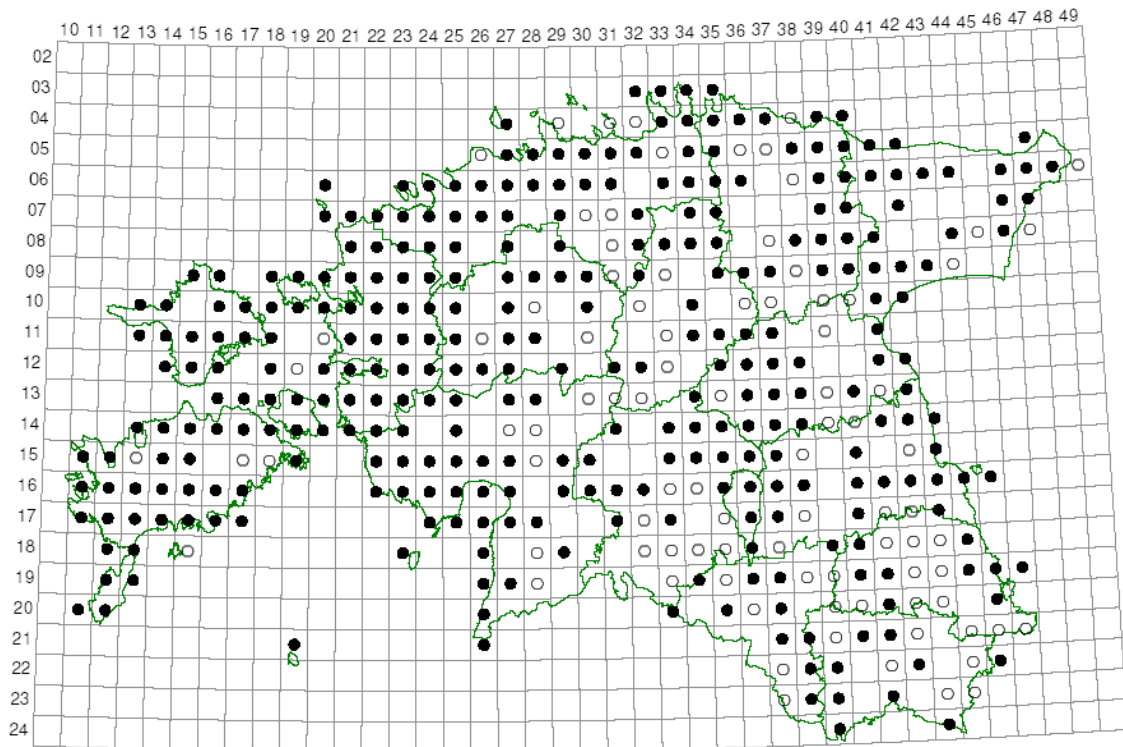
Eestis on levinud 3 robirohu liiki, mida mõned autorid on jaganud seitsmeks liigiks (Kask 1969) või alamliigiks (Kask 1969; Soo & Webb 1972; Ivanina 1981; Kask *et al.* 1996; Reier 1999):

1. saaremaa robirohi – *Rhinanthus osiliensis* (Ronniger et Saarsoo) Vassilcz.
[*Rhinanthus rumelicus* Velen subsp. *osiliensis* Ronniger et Saarsoo]
2. suur robirohi – *Rhinanthus angustifolius* C.C.Gmel.
[*Rhinanthus serotinus* (Schönh.) Oborny; *Rhinanthus major* Ehrh.]
subsp. *vernalis* (N.W.Zinger) Soó – kevad-robirohi
subsp. *aestivalis* (N.W.Zinger) Soó – suvi-robirohi
subsp. *apterus* (Fr.) Soó – tiivutu robirohi
subsp. *angustifolius* – mägi – robirohi
3. väike robirohi – *Rhinanthus minor* L.
subsp. *minor* – väike robirohi
subsp. *stenophyllus* (Schur) O.Schwarz – ahtalehine robirohi

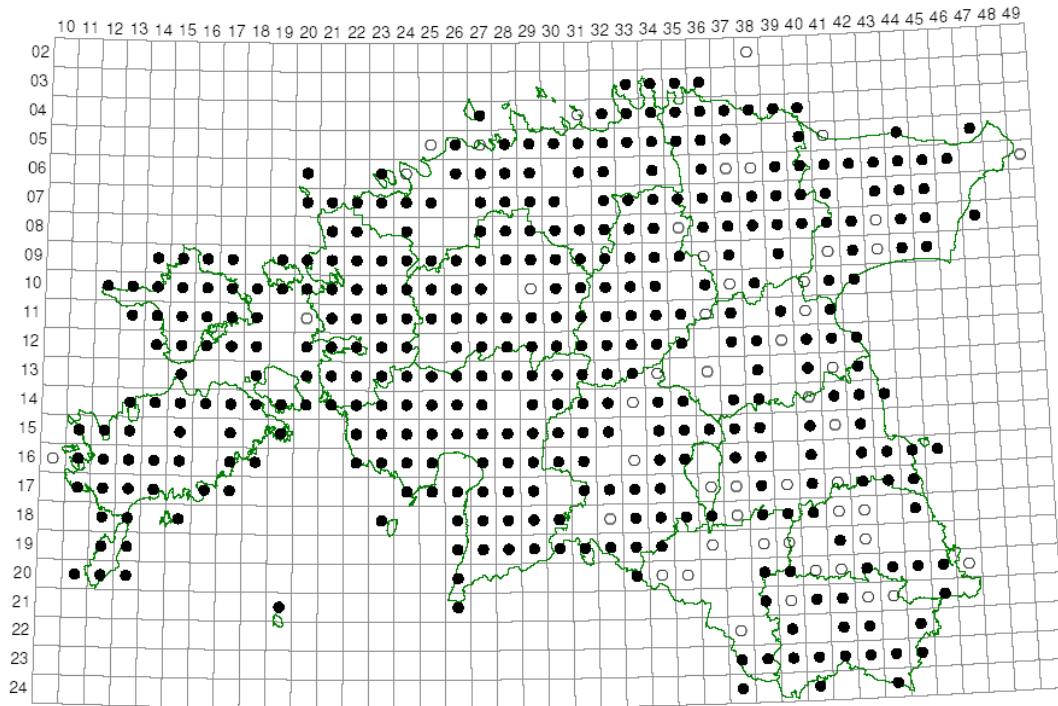
Suur robirohi *R. angustifolius* on levinud Ida-, Kesk- ja Lääne-Euroopas, Skandinaavias, Siberis, ja Väike-Aasias. Teda esineb tulnukliigina ka Põhja-Ameerikas. Eestis on suur robirohi sage (Kask 1969; Kukk & Kull 2005) (joonis 1).

Väike robirohi *R. minor* kasvab Kesk- ja Lõuna-Euroopas, Islandil, Skandinaavias, Ees-Kaukasuses ja Lääne-Siberis. Eestis on väike robirohi tavaline (Kask 1969; Kukk & Kull 2005) (joonis 2).

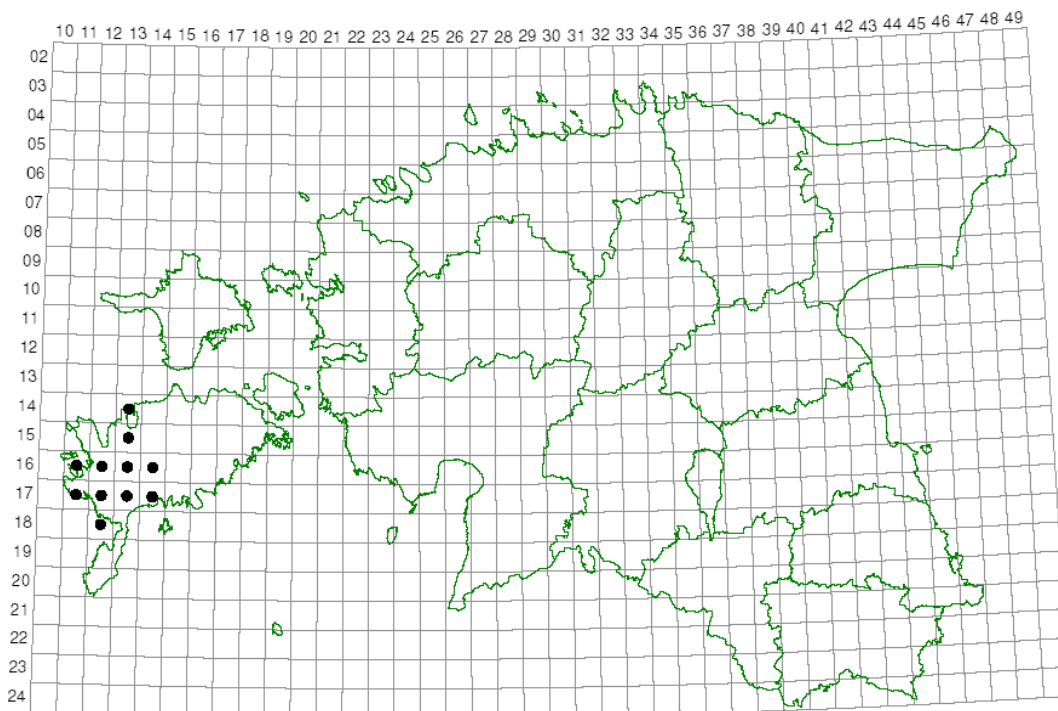
Saaremaa robirohi *R. osiliensis* on saare endeem, mida on leitud Saaremaa lääne- ja loodeosas. Enamik leiukohtadest on Viidumäe looduskaitsealal või selle ümbruses. Liiki on leitud veel Saaremaa läänerannikul Vilsandi rahvuspargist, Mustjala ümbrusest, Lääne-Saaremaa kõrgustiku jalamilt ja Kuusnõmme poolsaarelt (Reitalu 2003) (joonis 3).



Joonis 1. Suure robirohu Eesti levikukaart (Kukk & Kull 2005). • – antud ruudus on liiki leitud aastatel 1971 – 2005; o – antud ruudus on liiki leitud aastatel 1921 – 1970.



Joonis 2. Väikese robirohu levik Eestis (Kukk & Kull 2005). ● – antud ruudus on liiki leitud aastatel 1971 – 2005; ○ – antud ruudus on liiki leitud aastatel 1921 – 1970.



Joonis 3. Saaremaa robirohu levik Eestis (Kukk & Kull 2005). ● – antud ruudus on liiki leitud aastatel 1971 – 2005.

1.3 Saaremaa robirohu *Rhinanthus osiliensis* üldiseloomustus

Saaremaa robirohi avastati esmakordselt 1933 aastal Lääne-Saaremaalt. Algselt määras leidja Saarsoo uue taime kui *Alectorolophus* (perekonna *Rhinanthus* sünonüüm) *rumelicus* (Velen.) Borbàs. (Saarsoo 1934; Ronniger 1934). Viini botaanik Ronniger määras Saarsoo poolt saadetud eksemplarid uueks rumeelia robirohu alamliigiks *Rhinanthus rumelicus* Velen. subsp. *osiliensis* Ronniger et Saarsoo (Ronniger 1934). Esmakordselt käsitles saaremaa robirohtu eraldi liigina Vassiltšenko (1955) Nõukogude Liidu flooras.

Tänapäeval käsitletakse saaremaa robirohtu erinevates määrajates ja floorades nii eraldi liigi *Rhinanthus osiliensis* (Ronniger et Saarsoo) Vass. (Kask 1969; Ivanina 1981; Reier 1999) kui ka alamliigina *Rhinanthus rumelicus* subsp. *osiliensis* Saarsoo (Soo & Webb 1972; Kukk 1999; Kukk 2005). Antud töös käsitleme me saaremaa robirohtu eraldi liigina.

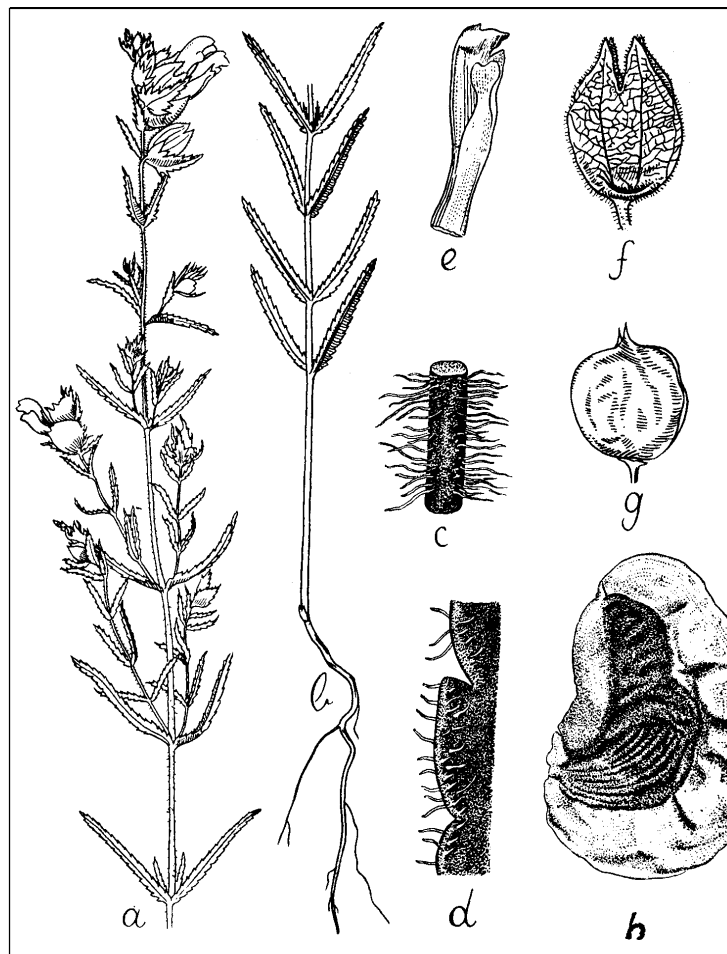
Rhinanthus osiliensis on alates 1958 aastast Eestis kaitse all. Hetkel kuulub ta II kaitsekategooriasse. Liik on paigutatud Eesti punase raamatu kolmandasse ehk haruldaste liikide kategooriasse (Kuusk 1998; Reitalu 2003).

Saaremaa robirohtu on uuritud vaid kaitsealuste liikide seire objektina (Reitalu 2003). Peamiselt on kirjeldatud tema kasvukohti, fenoloogiat ja arvukust. Liigi geneetilist mitmekesisust ja paljunemisviisi pole kunagi uuritud.

1.3.1 Saaremaa robirohu morfoloogia ja võrdlus rumeelia robirohuga

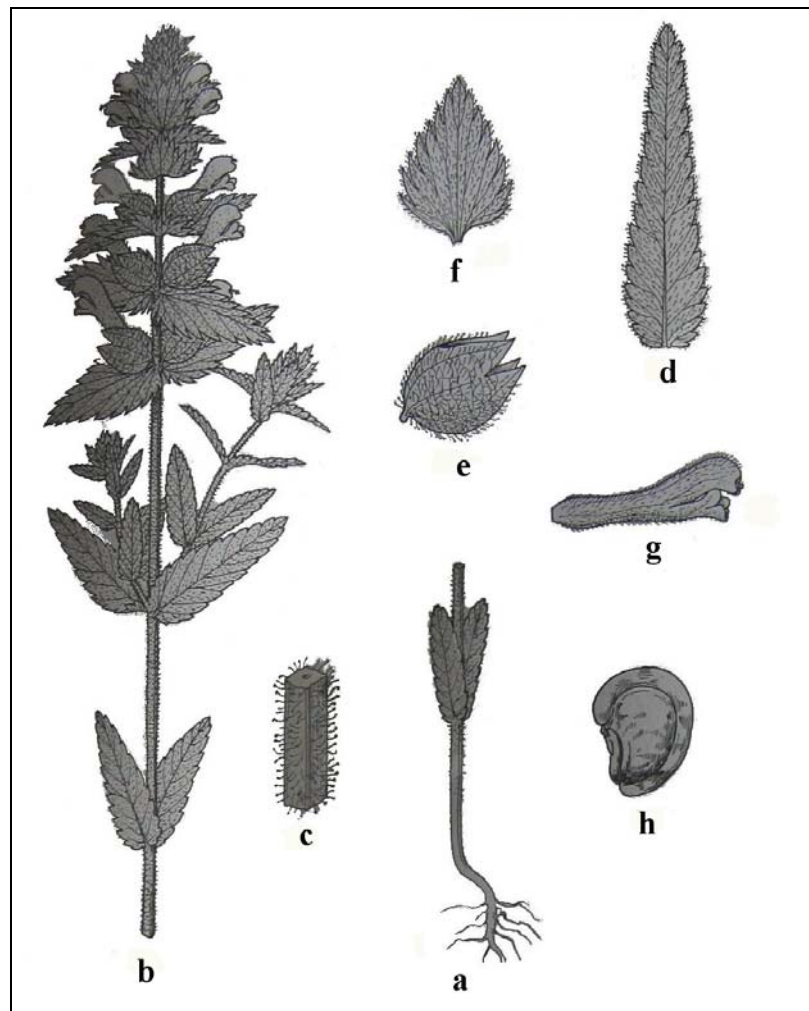
Kirjanduses on kokkuvõtlikult saaremaa robirohtu kirjeldatud järgnevalt (Saarsoo 1934; Ronniger 1934; Eichwald 1960; Kask 1969) (joonis 4). Saaremaa robirohi on 20-50 cm kõrgune üheaastane poolparasiitne taim. Taime ülemine osa, eriti varre- ja kõrglehed, õiekroon, -tupp ja kuprad on tihedalt kaetud pikkade mitmerakuliste näärmekarvadega. Näärmekarvad on heledad ja läbipaistvad, nende pea on õrnalt laienenud. Taimel on

ülemises osas 1-9 enamasti steriilset harudepaari. Varrel on arvukalt lühikesi sõlmevahesid, mis on varre alumises osas lehtedest lühemad ning ülemises osas lehtede pikkused või pikemad. Lineaarsed varrelehed on 2-5 mm laiad ja kuni 30 mm pikad, mõlemalt pinnalt tihedalt näärmekarvased. Interkalaarlehti on tavaliselt 1-4 paari. Õite kandlehed on tihedalt näärmekarvased, 6-10 mm laiused ja nende hambad lühenevad aluselt tipu suunas. Õisik algab 16.-24. sõlme juurest. Helekollane õiekroon on 18-20 mm pikkune, veidi ülespoole kõverdunud putke ja suletud neeluga. Kupras arenevad väikesed tiivulised seemned. Täisõitsengu saavutab liik juuli lõpus ja augustis.



Joonis 4. Saaremaa robirohi *Rhinanthus osiliensis* (Eichwald 1960). a – õitsva taime ülemine osa; b – taime alumine osa koos juurega; c – tükk varre ülemisest osast; d – leheserv varre ülemisest osast; e – õiekroon; f – tupp; g – vili; h – seeme.

Saarsoo poolt saadatud eksemplaride näärmekarvasuse tõttu määras Ronniger need rumeelia robirohu alamliigiks *Rhinanthus rumelicus* subsp. *osiliensis* (Saarsoo 1934; Ronniger 1934). Siiski, rumeelia robirohi erineb saaremaa robirohust mitme morfoloogilise tunnuse poolest (joonis 5, tabel 1). Rumeelia robirohi on vähem harunenud pikkade sõlmevahedega taim ja õisik algab juba 5.-10. sõlmevahest. Saaremaa robirohule on iseloomulikuks väiksed steriilsed külgharud, lühikesed sõlmevahed ja õisik algab alles 12.-24. sõlmevahest. Peale selle on rumeelia robirohu varrelehed saaremaa robirohu lehtedest kuni neli korda laiemad.



Joonis 5. Rumeelia robirohi *Rhinanthus rumelicus* (Asenov 1995). a – taime alumine osa koos juurega; b – õitseva taime ülemine osa; c – tükk varrest; d – varreleht; e – tupp; f – kõrgleht; g – õiekroon; h – seeme.

Tabel 1. Liikide *R. rumelicus* ja *R. osiliensis* tunnuste võrdlus (Ronniger 1934; Eichwald 1960; Kask 1969; Soo & Webb 1972; Reier 1999).

Tunnus	<i>R. rumelicus</i> (Eichwald 1960; Soo & Webb 1972; Asenov 1995)	<i>R. osiliensis</i> (Saarsoo 1934; Ronniger 1934; Kask 1969)
Kõrgus	Kuni 60 cm	20-50 cm
Harupaaride arv	Harunemata või 1-3 paari	1-9 paari
Sõlmevahed	Pikad, vähearvulised	Lühikesed, palju
Interkalaarlehed	0-2 paari	1-4 paari
Varrelehtede laius	10-20 mm	2-5 mm
Õisik algab	5.-10. sõlmevahest	12.-24. sõlmevahest
Näärmekarvasus	Taime ülemine osa hõredalt kuni tihedalt näärmekarvane	Varred, lehed, õietupp, kroon, viljad tihedalt näärmekarvased
Õitseae	Mais, juunis	Juulis, augustis
Kasvukoht	Niidutaim	Sootaim
Levik	Ungari, Balkanimaad, Väike-Aasia	Eestis Saaremaa lääneosa

1.3.2 Liikide bioloogia

Saaremaa robirohi on aeglasema arenguga kui teised Eestis kasvavad robirohu liigid (Reitalu 2003). Viidumäe looduskaitsealal teostatud pikaajalised fenoloogilised vaatlused ja monitooring on täheldanud, et saaremaa robirohu tõusmed ilmuvad juba aprilli lõpus või mai alguses, kuid õiepungad tulevad nähtavale alles juuli teisel poolel. Selleks ajaks on temaga samal ajal tärganud väikesel robirohul viljad juba valminud.

Saaremaa robirohul on ka rumeelia robirohust aeglasem areng. Seemnete idandamisel selgus, et rumeelia robirohu seemnetel kestab puhkeperiood ligikaudu kaks kuud, saaremaa robirohu seemnetel aga neli kuud. Teiseks erinevuseks on õitseage. Saaremaa robirohi õitseb juuli lõpus ja augustis (Reitalu 2003), seevastu rumeelia robirohu täisõitseng on mais ja juunis (Soo 1929; Ronniger 1934; Soo & Webb 1972).

Mõlemad liigid on eeldatavasti putuktolmlejad (Eichwald 1960). Seemned levivad gravitatsiooni abil ja seetõttu ei ulatu seemnelevi kaugemale, mida kinnitavad ka seemnetest tärganud taimed, mis paiknevad laikudena eelmise aasta vanade kuuivanud taimevarte ümber. Kromosoomide arv on $2n = 22$ (Ivanina 1981), mis viitab polüploidisusele, kuid polüploidisuse tüüp ei ole teada.

1.3.3 Liikide levik ja ökoloogia

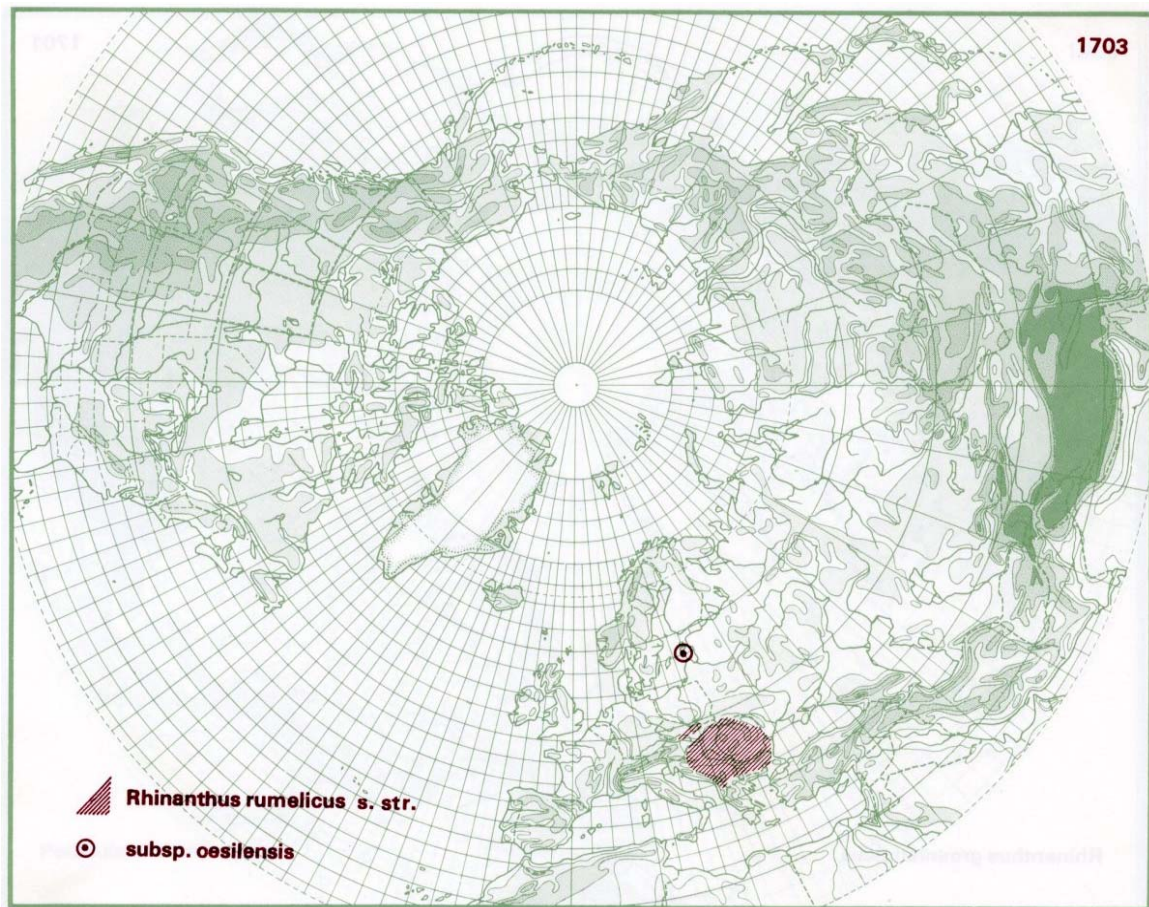
Saaremaa robirohu levila on Saaremaal, Viidumäe looduskaitsealal ja Vilsandi rahvusparkis. Liigi koguarvukus levila piires on ligikaudu 26 000 indiviidi (Reitalu 2003). Eelistatud kasvukohad on allikasood, mis paiknevad kunagise rannaastangu jalamil. Allikasoodele on iseloomulik mosaiikne mikroreljeef, eriline mikrokliima, niiskus ja mullatingimused. Turbahorisont on 30-100 cm paks, pH 6,0 – 7,0.

Liigi isendeid võib leida ka liigirikastest madalsoodest ja soonitudelt. Peale eelnimetatud kasvukohtade on liiki leitud veel kuivenduskraavide ja ojade kallastelt ning märgadelt meetsateedelt. Need aga ei ole saaremaa robirohule sobivad kasvukohad ja liik

on mõne aja pärast sealt kadunud (Reitalu 2003).

Isendeid, mis meenutavad saaremaa robirohtu, on leitud ka Gotlandilt Gerum allikasoodest, aga need pole seni siiski määratud liigina *R. osiliensis* (Lindell 2006).

Rumeelia robirohu levilaks on peamiselt Balkanimaad (Soo 1929; Soo & Webb 1972) (joonis 6). Kasvukohtadeks on kuivemad niidud ja heinamaad ning tema esinemist soistel aladel pole mainitud (Soo 1929; Ronniger 1934; Eichwald 1960).



Joonis 6. *Rhinanthus osiliensis* (siin subsp. *osiliensis*) (kaardil tähistatud ringiga) ja *Rhinanthus rumelicus* (viirutatud alal) üldlevik (Hultén & Fries 1986).

2. Endeemsete liikide geneetiline varieeruvus

Liikide ja populatsioonide geneetilist mitmekesisust mõjutavad erinevad faktorid, nagu näiteks paljunemisviis, populatsioonide suurus ja isolatsioon, geograafiline levik, ajalugu ning inimõju (Loveless & Hamrick 1984; Hamrick & Godt 1989). Väikeste ja isoleeritud populatsioonide geneetiline varieeruvus mõjutavad oluliselt geenitriiv ja/või inbriiding, mille tulemusena väheneb polümorfsete lookuste hulk ja alleelide arv lookuses ning toimub alleelide fikseerumine. Lõpptulemuseks on heterosügootsuse ja geneetilise mitmekesisuse vähenemine (Hamrick & Godt 1989; Frankham 1998; Evans *et al.* 2001).

Geograafilisest või reproduktiivsest isolatsioonist tingitud geenisiirde puudumine põhjustab järk-järgult populatsioonide eristumise. Diferentseerumist suurendavad ka looduslik valik ja juhuslik geenitriiv (Newman & Tallmon 2001).

Populatsioonide geneetilist varieeruvust kujundab veel liikide paljunemisviis. Võõrtolmlejal, võrreldes isetolmlejatega, on kõrgem geneetiline varieeruvus populatsiooni sees ja väiksem eristumine populatsioonide vahel (Hamrick & Godt 1989). Teiseks oluliseks faktoriks on seemnelevi, kus seemnete edukas kauglevi suurendab geneetilist mitmekesisust (Hamrick 1989).

Endeemsetel liikidel on sageli väikesed ja isoleeritud populatsioonid ja seetõttu arvatakse neil olevat suhteliselt madal geneetiline varieeruvus (Hamrick *et al.* 1991; Karron 1991; Ellstrand & Elam 1993; Glover & Abbott 1995). Isoensüümtunnuste alusel on leitud nii madala geneetilise mitmekesisuse (Hamrick *et al.* 1991; Karron 1991; Ellstrand & Elam 1993; Glover ja Abbott 1995) kui ka kõrge geneetilise mitmekesisusega (Helenurm *et al.* 2005; Ohkawa *et al.* 2006) endeemseid liike.

Geneetiline varieeruvus on hädavajalik liigi adaptatsioonil (st. kohastumisel) muutuvates keskkonnatingimustes (Frankel *et al.* 1995; Lande 1995). Seega, liikide ellujäämine ja ökoloogiline edukus sõltub geneetilisest mitmekesisusest ning madala geneetilise varieeruvusega liikidel on suurem oht väljasuremiseks võrreldes kõrgema geneetilise mitmekesisusega liikidega (Huenneke 1991; Menges 1990; Helenurm *et al.* 2005). Sellest tulenevalt on endeemid ja eriti saarte populatsioonid palju suuremas väljasuremise ohus kui maismaa liigid (Frankham 1998).

3. Töö eesmärgid

1. Tuvastada saaremaa robirohu (*R. osiliensis*) ja tema oletatava kõige lähedasema liigi *R. rumelicus* isoensüümtunnuste liigisisest varieeruvust.
2. Isoensüümtunnuste alusel iseloomustada liikide paljunemisviisi.
3. Selgitada välja liikide ploidsuse tüüp.
4. Iseloomustada liikide geneetilist eristumist.
5. Saadud tulemuste põhjal täpsustada *R. osiliensis* taksonoomiline staatus.

4. Materjal ja meetodika

4.1 Välitööde meetodika

Saaremaa robirohu leheproovid ja seemned korjati 2005. ja 2006. aasta suvel ning sügisel. Kokku uuriti kümme erineva suurusega saaremaa robirohu populatsiooni: Marisoo, Vahtrissoo, Paatsasoo, Odalätsi, Oiu, Vesiku oja, Suurissoo, Haavassoo, Sutru ja Õpperajasoo (joonis 7). Välitööde käigus kirjeldati populatsioonide kasvukohti, hinnati populatsioonide suurust, märgiti iga populatsiooni kooridnaadid ja koguti herbaareksemplar, mida säilitatakse Tartu Ülikooli Herbaariumis (tabel 2).

Isoensüümanalüüsideks korjati iga populatsiooni kümnel juhul juhuslikult valitud taimelt 4-5 lehte. Jälgiti, et uuritud indiviidide vaheline kaugus oleks minimaalselt 10 meetrit. Mõlema aasta sügisel korjati suurematest populatsioonidest (Õpperaja soo, Suurissoo, Vahtrissoo, Haavassoo, Sutru ja Vesiku oja) seemneid, et kasvatada laboris taimed ja analüüsida rohkem indiviide.

Gotlandilt leitud saaremaa robirohule sarnaste isendite populatsioonist saatis Rootsi botaanik Lindell seemned koos tõendeksemplariga. Tõendeksemplari morfoloogilised tunnused olid väga sarnased saaremaa robirohuga ja antud uurimustöös käsitletakse teda liigina *R. osilensis*.

Tänu Bulgaaria teadlase G. Angelovi abile saime *R. rumelicus* seemneproovid kaheksast populatsioonist (tabel 3). Igast populatsioonist saadeti ka herbaareksemplar.

Kokku analüüsiti 326 isendit, neist 222 *R. osiliensis* isendit ja 104 *R. rumelicus* isendit.



Joonis 7. Liigi *R. osiliensis* kümme uuritud Saaremaa populatsiooni: Marissoo, Vahtrissoo, Paatsasoo, Oidalsi, Oiu, Vesiku oja, Suurissaar, Haavassoo, Sutru ja Õpperajasoo (Aluskaart Regio CD-atlas 1999 järgi). ● – näitab populatsioonide asukohta. Iga punkti kohal on uuritud populatsiooni nimi.

Tabel 2. Saaremaa robirohu *R. osiliensis* uuritud populatsioonide iseloomustus ja analüüsitud indiviidide arv. Sulgudes on andmeanalüüsis kasutatud populatsioonide nimede lühendid.

Populatsiooni nimi (lühend)	Koordinaadid	Kasvukoht	Populatsiooni suurus	Analüüsitud isendite arv
Marisoo (Ma)	58°18'04N/ 022°11'10E	Niiske allikasoo	< 100 indiviidi	9
Vahtrissoo (Va)	58°18'33N/ 022°08'48E	Niiske allikasoo	< 100 indiviidi	18
Paatsasoo (Pa)	58°30'25N/ 022°18'54E	Niiske allikasoo mere lähedal	< 100 indiviidi	27
Odalätsi (Od)	58°23'16N/ 022°07'06E	Niiske metsatee	< 50 indiviidi	18
Oiu (Oi)	58°23'25N/ 022°00'14E	Niiske võsastunud mere kallas	< 50 indiviidi	10
Vesiku oja (Ve)	58°20'12N/ 021°59'25E	Niiske allikasoo	< 50 indiviidi	17
Suurissoo (Su)	58°17'07N/ 022°04'04E	Vähem niiskem allikasoo	> 1000 indiviidi	30
Haavassoo (Ha)	58°14'34N/ 022°10'07E	Niiske allikasoo	< 100 indiviidi	38
Sutru (Sut)	58°16'00N/ 022°06'47E	Niiske allikasoo astangu jalamil	> 1000 indiviidi	26
Õpperajasoo (Op)	58°17'41N/ 022°05'21E	Niiske allikasoo, astangu jalamil	> 1000 indiviidi	27

Tabel 3. Liigi *R. rumelicus* Bulgaaria populatsioonid ja indiviidide arv. Sulgudes on andmeanalüüsis kasutatud populatsioonide nimede lühendid.

Populatsiooni nimi (lühend)	Analüüsitud isendite arv
Ahodopes Mnt., Dospat Borino (DB)	12
Srednagova Mnt., Dushantzi (Du)	3
Sregnagova Mnt. Anton (An)	2
Vachanska Mnt., Balvan Range (BR)	4
Vitosha Mnt., Bistritza (Bi)	16
Golo bardo Mnt., Znepole (Zn)	19
Volosh Mnt. Vlenovik (VI)	32
Vitosha Mnt. Mavchaevo (Ma)	16

4.2 Isoensüümanalüüs

Isoensüümelektroforees on üks levinumaid geneetilise varieeruvuse tuvastamise meetodeid. Isoensüümanalüüs põhineb ensüümi erinevate molekulaarsete vormide fraktsioneerimises elektriväljas. Valgu molekulid migreeruvad vastavalt oma molekulaarkaalu ja koostises olevate aminohapete laengule (Hamrick 1989).

Algselt proovitud 15 erinevatest ensüümi andsid kuus selgeid ja geneetiliselt interpreteeritavaid tulemusi. Edaspidi uuriti ainult nimetatud kuut ensüümi: fosfoglükoiisomeraas (*phosphoglucoisomerase* PGI, EC 5.3.1.9), aspartaadi aminotransferaas (*aspartate aminotransferase* AAT, EC 2.6.1.1.), shikimaadi dehüdrogenaas (*shikimate dehydrogenase* SKD, EC 1.1.1.25), fosfoglükomutaas (PGM, EC 5.4.2.2), 6-fosfoglükonaadi dehüdrogenaas (*6-phosphogluconate dehydrogenase* PGD, 1.1.1.44) ja peroksüdaas (peroxidase PRX, EC 1.11.1.7.).

Analüüsi tulemuste mõistmiseks on oluline teada, et isoensüümid on geneetiliselt kodeeritud ühe ja sama ensüümi erinevad molekulaarsed vormid. Antud töös eristatakse kahte isoensüümid põhitüüpi (Jaaska & Jaaska 1984):

1. Allosüümid ehk allelosüümid ehk alloensüümid (*allozymes=allelozymes=alloenzymes*) on geneetiliselt homoloogsed isosüümid, mis on kodeeritud sama lookuse erinevate alleelide poolt. Teisiti öeldes, allosüümid on teatud isosüümi elektorforeetilised variandid ehk elektormorfid, mida siin tähistatakse numbritega.
2. Heterosüümid (*heterozymes*) on geneetiliselt heteroloogsed isosüümid, mis on kodeeritud sama geeni erinevate lookuste poolt. Nad on tähistatud suurte tähtedega vastavalt nende elektroforeetilisele liikuvusele.

4.2.1 Ensüümekstraktide valmistamine ja polüakrüülamiid - geelelektroforeesi (PAGE) geelide koostised

Ensüümekstraktid valmistati värsketest lehtedest. Selleks purustati üks taimeleht (umbes 1 cm²) 0,3 ml homogeniseerimispuhvrts. Homogeniseerimispuhvri (pH = 8,0) koostis oli järgmine: 1,51g Tris (0,05 M) + 0,73 g EDTA-H₂ +(0,01 M) + 0,5 ml 1 M MgSO₄+ 250 ml H₂O. Ensüümide stabilisaatorina lisati 1 tilk tioglütserooli 2 ml puhvri kohta.

Peale taimse materjali purustamist lisati homogenaatidele viskoossuse tõstmiseks 20 - 50 mg sahharoosi ja Sephadexi G – 200 segu (4:1). PAGE viidi läbi elektroforeesiaparaadiga EC120 Mini Vertical Gel System voolutugevuse 15 mA ja pinge 20 - 30 V/cm juures 2 - 2,5 tundi.

Geel valmistati kolmest lahusest proportsioonis 6 ml akrüülamiidlahust (A), 3 ml geeli puhvrit (B) ja 3 ml riboflaviin-5-fosfaat lahus (R). Järgnevalt on antud kolm A, neli B ja kaks R alglahuse retsepti, mida kasutati kuue erineva ensüümi fraktsioneerimiseks (sulgudes on lõppkontsentratsioonid).

Akrüülamiidlahus (A):

A2: 10,0 g akrüülamiid (edaspidi AA) (20 %)
200 mg N,N' - bisakrüülamiid (edaspidi Bis) (0,4 %)
40 ml H₂O

A6: 6 g AA (15 %)

120 mg Bis (0,3 %)

34 ml H₂O

A7: 6 g AA (15 %)

160 mg Bis (0,4 %)

34 ml H₂O

Geeli puhver (B):

B2 (pH = 9,3):

6,3 g Tris·HCl (0,4 M)

14,6 g Tris (1,2 M)

0,2 ml TEMED (N,N,N',N'- tetrametüületüleendiamiin)

100 ml H₂O

B3 (pH = 9,2):

4,7 g Tris·HCl (0,3 M)

8,5 g Tris (0,7 M)

0,2 ml TEMED

100 ml H₂O

B4 (pH = 8,98):

6,3 g Tris·HCl (0,4 M)

7,3 g Tris (0,6 M)

0,2 ml TEMED

100 ml H₂O

B6 (pH = 8,4):

6,3 g Tris·HCl (0,4 M)

2,4 g Tris (0,2 M)

0,2 ml TEMED

100 ml H₂O

Riboflaviin-5-fosfaat lahus (R):

R1: 0,3 ml riboflavin-5-fosfaat põhilahust + 0,1 ml (NH₄)₂S₂O₈ põhilahust + 10

ml H₂O

R₂: 0,3 ml riboflavin-5-fosfaat põhilahust + 0,1 ml (NH₄)₂S₂O₈ põhilahust + 10 ml glütseriini (50%)

Riboflaviin-5-fosfaat põhilahus: 20 mg riboflaviin-5-fosfaati + 10 ml H₂O

(NH₄)₂S₂O₈ põhilahus: 80 mg of (NH₄)₂S₂O₈ + 2 ml H₂O.

Isoensüümide elektorforeesi paremate tulemuste saamiseks kasutati erinevaid geeli koostiseid: SKD ja PGD – A₂B₆R₂, AAT – A₂B₆R₁, PGI – A₇B₂R₁, PRX – A₆B₂R₁, PGM-A₂B₄R₁.

Anoodpuhver oli alati ühesugune ja sisaldas 6 g Tris ja 0,6 ml CH₃COOH 11 H₂O, pH = 8 - 9.

Katoodpuhvrina kasutati kahte erinevat lahust:

AK₁ sisaldab 0,6 g glütsiini (0,08 M) + 0,2 g Tris (või 0,1 g KOH) + 100 ml H₂O.

AK₆ sisaldab 1,4 g β-alanine (0,16 M) + 0,2 g Tris (või 0,1 g KOH) + 100 ml H₂O.

Katoodpuhvreid kasutati järgnevalt: AK₁ - AAT, PGM, PGD ja SKD; AK₆ - PRX ja PGI elektroforeesil.

4.2.2 Ensüümogrammide ilmutamine

Geelide värvimiseks kasutati Wendel ja Weeden (1989) histokeemilisi meetodeid modifitseeritud Jaaska (1990) poolt.

Fosfolükoiisomeraas PGI (EC 5.3.1.9.)

40 ml puhvrit (E1) (6 g Tris + 500 ml H₂O + 1 ml kontsentreeritud HCl + 5 ml 10% Triton X-100) valati geelile. Lisati 2 ml NADP (50 mg NADP + 10 mg EDTA-Na₂ 20 ml H₂O-s), 20 mg fruktoos-6-fosfaat- Na₂ soola, 0,08 ml 1 M MgSO₄ (24,6 g/100 ml

H₂O) ja kaks tilka G6PDH lahust (2 ml E puhver + 2 ml 50% glütseriini + 10 mg glükoos-6-fosfaat + 5 mg NADP + 5 mg glükoos-6-fosfaatdehüdrogenaas). Lõpuks lisati 2 ml MTT (*tetrazolium thiazolyl blue*) (200 mg/50 ml H₂O-s) ja 0,4 ml PMS (*phenazine methosulfate*) (25 mg/10 ml H₂O-s). Geeli inkubeeriti pimedas 35^o C juures, seda aeg-ajalt loksutades kuni tsoonide ilmumiseni.

Aspartaadi aminotrasferaas AAT (EC 2.6.1.1)

40 ml puhvrit (AAT) (6 g Tris + 500 ml H₂O + 1 ml kontsentreeritud HCl + 2 g Ca(NO₃)₂) valati geelile. Lisati 2 ml substraadi lahust (1,32 g L-asparagiinhapet (0,2 M) + 0,72 g α-ketoglutaarhape (0,1 M) + 2,4 g Tris (0,4 M) + 50 ml H₂O). Geeli inkubeeriti pimedas 30 minutit 35^o C juures. Peale seda asetati geel järgnevasse lahusesse: 40 ml AAT puhver + eelnevalt 20-30 minutit külmas hoitud 4 ml 0,01 M o-dianisidiinilahus (0,25 g o-dianisidiin 2HCl + 5 ml kontsentreeritud HCl + 95 ml H₂O + 0,2 ml 7% NaNO₂), kuni tsoonide ilmumiseni.

Fosfoglükomutaas PGM (EC 5.4.2.2)

40 ml puhvrit (E) (6 g Tris + 500 ml H₂O + 1 ml konts. HCl + 1 ml 1 M MgSO₄ + 5 ml 10% Triton X - 100) valati geelile, lisati 30 mg glükoos-1-fosfaati, 2 ml NADP + 1 ml MTT + 0,4 ml PMS ja kaks tilka G6PDH lahust. Geeli inkubeeriti kuni tsoonide ilmumiseni pimedas temperatuuril 35^o C.

Shikimaadi dehüdrogenaas SKD (EC 1.1.1.25)

40 ml E-puhvrit valati geelile. Lahusele lisati 2 ml NADP lahust, 5 mg shikiimhapet, 1 ml MTT ja 0,4 ml PMS. Geeli inkubeeriti pimedas temperatuuril 35^o C kuni tsoonide ilmumiseni.

6-fosfoglükonaadi dehüdrogenaas PGD (EC 1.1.1.44)

40 ml E-puhvrit valati geelile. Lahusele lisati 2 ml NADP lahust, 20 mg 6-fosfoglükonaati, 1 ml MTT ja 0,4 ml PMS. Geeli inkubeeriti pimedas temperatuuril 35^o C kuni tsoonide ilmumiseni.

Peroksüdaas PRX (EC 1.11.1.7)

Geelile valati 40 ml puhvrit (11.6 g maleiinhape + 7 g KOH + 5 ml 10% Triton X - 100 500 ml H₂O-s), lahusele lisati 0,6 ml 0,1 M o-dianisidiin-dihüdrokloriidi (1,6 g/50

ml H₂O) ja 0,6 ml 0,1 M pürokatehhiini lahust (0,6 g pürokatehhiin + 0,3 g 0,05 M oksaalhapet + 50 ml H₂O) + 0,2 ml 1% H₂O₂. Geeli inkubeeriti lahuses toatemperatuuril pruunide tsoonide ilmumiseni.

Peale ensüümide värvumist loputati geelid tavalise veega ja värvumise peatamiseks asetati nad fiksaatorisse (750 ml H₂O + 250 ml C₂H₅OH + 10 ml 1:1 lahjendatud HCl).

Ensüümogrammide geneetilisel interpreteerimisel toetuti Wendel ja Weedeni (1989) ensüümide struktuure kirjeldavale tööle.

5. Andmete analüüs

Isoensüümmandmete analüüsiks kasutati programmi GENALEX 6 (Peakall & Smouse 2006). Liikide *Rhinanthus osiliensis* ja *R. rumelicus* geneetilise varieeruvuse iseloomustamiseks arvutati iga populatsiooni kohta polümorfsete lookuste protsent (P), alleelide keskmine arv lookuses (A), vaadeldud heterosügootsus H_o ja eeldatud heterosügootsus H_e . Wright'i inbriidingukoefitsient $F = 1 - H_o/H_e$ (Wright 1951) ja paljunemisviisi kirjeldav risttolmlemise koefitsient $t = (1 - F)(1 + F)$ (Weir, 1990) arvutati iga populatsiooni ja liigi kohta eraldi.

Populatsioonide ja liikide vahelist feneetilist eristumist analüüsiti programmiga PAUP*4.0b10 (Swofford 2000), kasutades lähima naabri (*neighbour-joining*) ja UPGMA ehk kaalumata paaride (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) meetodit. Allosüümid kodeeriti kui binaarsed (on / ei ole) tunnused.

6. Tulemused

Isoensüümtunnuste varieeruvus

Kokku analüüsiti 236 isendit, neist 222 *R. osiliensis* isendit (220 indiviidi kümnest Saaremaa ja kaks isendit ühest Gotlandi populatsioonist) ning 104 *R. rumelicus* isendit kaheksast Bulgaaria populatsioonist.

Ensüümide lookuste ja nende alleelide tähistamisel lähtuti iga ensüümi struktuurist (Weeden ja Wendel 1989). Lookused tähistati suurtähtedega, alustades kõige kiiremast. Alleelid igas lookuses tähistati numbritega, alustades samuti kõige kiiremast (anoodipoolsemast).

Kuuel uuritud ensüümil leiti 11 geneetiliselt informatiivset polümorfset lookust AAT-A, AAT-B, AAT-C, PGM-B, SKD-A, SKD-B, PGI-B, PRX-A, PRX-B ja PRX-C. Kahel liigil tuvastati kokku 28 erinevat alleeli, neist 27 alleeli esines *R. rumelicus* populatsioonides ja 21 alleeli *R. osiliensis* populatsioonides. Kõik esinenud alleelid ja nende esinemise sagedus on toodud lisas 1. *Rhinanthus osiliensis* näitas ühte liigispetsiifilist null-alleeli AAT-A3 lookuses. Liigi *R. rumelicus* populatsioonidest leiti kokku seitse unikaalset alleeli: AAT-B2, SKD-A2, SKD-A4, SKD-B2, SKD-B4, PGD-B4 ja null-alleel AAT-C3 (tabel 4).

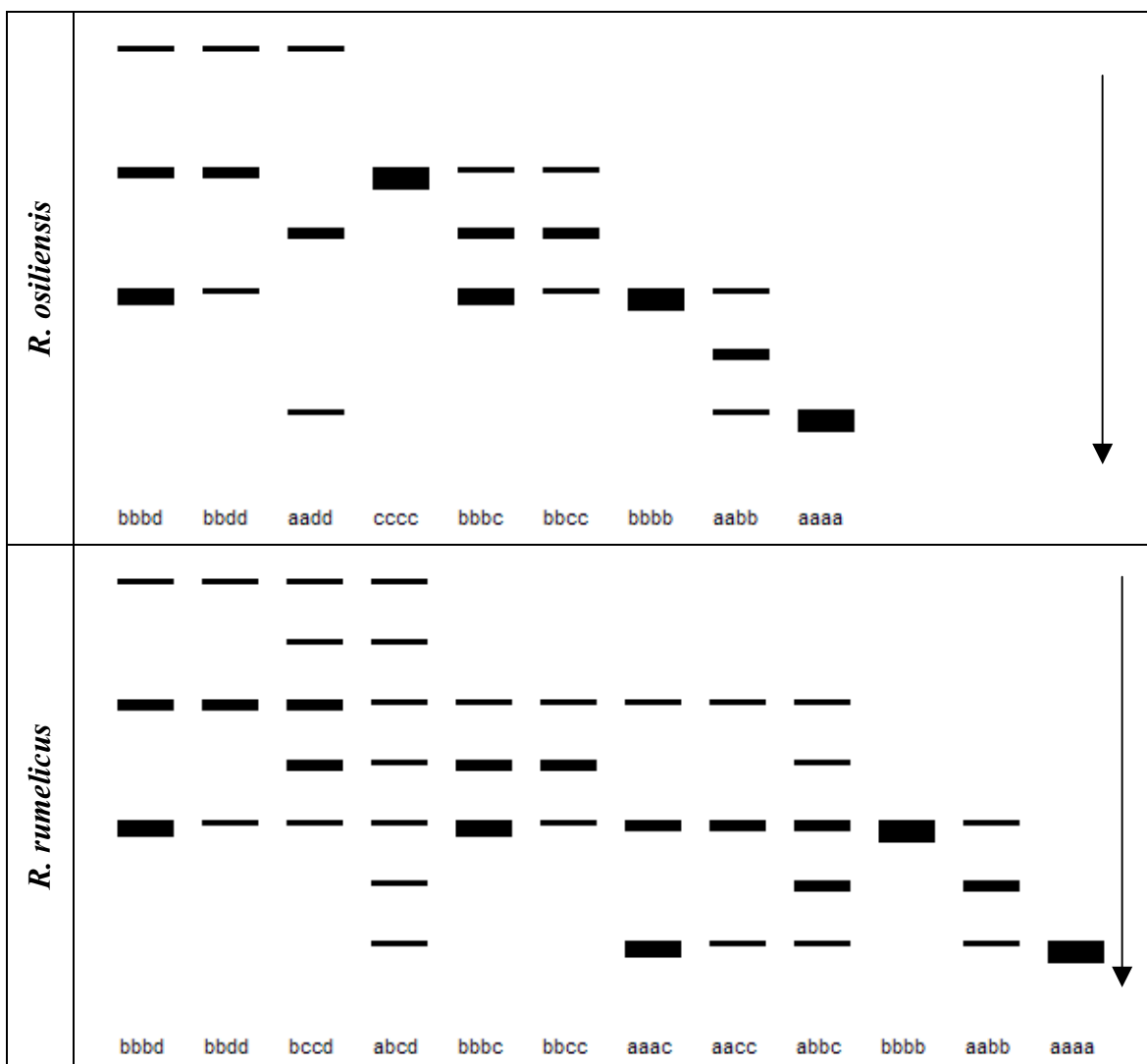
Mõlemal uuritud liigil leiti homosügootseid ja heterosügootseid heterosüüme (tabel 4). Dimeerse ensüümi heterosügootid kujutavad endast sümmeetrilisi kolmetäpilisi triplete; kus kodominantsed alleelid on servmised täpid (joonis 9). Monomeerse ensüümi heterosügootid avalduvad kahe täpina.

Kõik saaremaa robirohu isendid olid neljas lookuses monomorfsed (AAT-B, AAT-C, SKD-A ja SKD-B). Rumeelia robirohu populatsioonides oli vaid lookus AAT-A monomorfe. Tabelist 4 on näha, et peale vähenenud polümorfsete lookuste ja alleelide arvule on saaremaa robirohul ka madalam heterosügootide osakaal.

Tabel 4. Liikide *R. osilensis* ja *R. rumelicus* 11 isoensüümlookuse summaarne allosüümne varieeruvus.

	PGI B	AAT A	AAT B	AAT C	PGM B	SKD A	SKD B	PGD B	PRX A	PRX B	PRX C
<i>R. osilensis</i>	3	0	3	3	3	3	2	2	0	0	0
	4	3			4			3	2	4	6
	5				3/4			1/3			
	3/4							2/3			
	3/6										
	4/5										
	4/6										
<i>R. rumelicus</i>	3	3	2	0	3	3	2	2	0	0	0
	4		3	3	4	4	3	3	2	4	6
	3/4		2/3		3/4	2/3	4	1/3			
	3/5					3/4	2/3	2/3			
	4/5						2/4	2/4			
	4/6						3/4	3/4			
	3/4/5										
	4/5/6										
	3/4/5/6										

Fosfoglükoisomeraasi (PGI) ensüümogrammidel oli näha kahte lookust, millest lookus PGI-A oli invariantne. PGI-B oli polümorfne nii populatsioonide kui liikide vahel. Kokku tuvastati mõlemal liigil neli alleeli (tabel 4, joonis 9). Esines nii homo- kui heterosügoote. Liikide *R. osilensis* ja *R. rumelicus* PGI ensüümogrammidel leidis lisaks tasakaalustatud heterosügootidele ka tasakaalustamata heterosügoote, mida eristab täpide erinev värvumistugevus (joonis 9). Värvumistugevus on seotud kodeeriva geeni (alleeli) doosiga, mis üksikul indiviidil võib esineda 1 – 4 koopiaga ja mis on iseloomulik ainult autotetraploidile. Tasakaalustamata heterosügootide kõrval leiti kolmel liigi *R. rumelicus* isendil kolme ja nelja alleeliga topeltheterosügoote, mis samuti tõestab nende autotetraploidsust (joonis 9).



Joonis 9. Liikide *R. osiliensis* ja *R. rumelicus* PGI-B lookuse homo- ja heterosügootsete variantide skemaatilised fenotüübid. Iga fenotüübi all on eeldatavad genotüübid. Nool näitab valkude foreesil liikumise suunda.

Aspartaadi aminotrasferaasi (AAT) sümogrammid näitasid kolme vähe varieeruvat lookust: AAT-A, AAT-B ja AAT-C (tabel 4). *Rhinantus osiliensis* oli AAT-B ja AAT-C lookuses monomorfne ja homosügootne. AAT-A lookuses esines saaremaa robirohul varieeruvus: homosügootne AAT-A3 või sama alleeli inaktiveerumine ehk nullvariant. Liigi *R. rumelicus* populatsioonid olid vastupidiselt *R. osiliensis* populatsioonidele monomorfused lookuses AAT-A ja polümorfused lookustes AAT-B ja AAT-C. AAT-C lookus oli vähe varieeruv ja null – alleel tuvastati vaid ühes Vlenoviki

populatsioonis (lisa 1).

Fosfoglükomutaasi (PGM) sümogrammidel oli üks polümorfne lookus PGM-B (tabel 4). Antud lookuses oli kaks erinevat alleeli, mis esinesid mõlema liigi indiviididel nii homo- kui heterosügootidena.

Shikimaadi dehüdrogenaas (SKD) näitas kahte lähestikku paiknevat sõltumatut lookust, mis tähistati SKD-A ja SKD-B (tabel 4). Saaremaa robirohi oli mõlemas SKD lookuses monomorfne ja homosügootne. Rumeelia robirohu isenditel leiti mõlemas lookuses kolm erinevat alleeli, mis esinesid nii homo- kui heterosügootidena. Kahe liigi võrdlusel on näha, et SKD lookuste polümorfism nelja liigispetsiifilise alleeliga on iseloomulik liigile *R. rumelicus* (SKD-A2, SKD-A4, SKD-B3 ja SKD-B4).

6-fosfoglükonaatdehüdrogenaasi (PGD) sümogrammide näitasid ühte selget loetavat lookust PGD-B. Antud lookuses tuvastati kokku 4 erinevat alleeli, nendest kolm alleeli liigi *R. osiliensis* populatsioonides ja kõik neli alleeli liigi *R. rumelicus* populatsioonides. Rumeelia robirohu liigispetsiifiline alleel on PGM-B4. Mõlema liigi puhul leidis homo- ja heterosügootseid heterosüüme.

Peroksüdaasi (PRX) sümogrammide näitasid mõlemal liigil kolme sõltumatut heterosüümi. Kuna peroksüdaasi struktuur pole täpselt teada, siis ei saa me kindalt väita, kas tegemist on ühe või mitme lookusega. Andmetöötluses kodeeriti peroksüdaasi alleelid kolme erinevasse lookusesse vastavalt nende liikuvusele PRX-A, PRX-B ja PRX-C.

Kõige varieeruvamaks heterosüümiks oli PGI-B, mis näitas mõlemal liigil homo- ja heterosügootseid variante. Liigi *R. osilensis* populatsioonides avastati kokku seitse erinevat PGI fenotüüpi (tabel 4). Liigi *R. rumelicus* populatsioonides avastati kokku üheksa erinevat PGI-B varianti, millest kolm olid kolme ja nelja alleeliga topeltheterosügootid (tabel 4). Mõlemas liigis leiti tasakaalustamata heterosügootid, mis on iseloomulikud ainult autotetraploidsele genoomile (joonis 9). Teistes isosüümides topeltheterosügootid ja tasakaalustamata heterosügootsust ei tuvastatud.

Liigisisene ja liikidevaheline geneetiline eristumine

Kahe liigi populatsioonidevahelise geneetilise mitmekesisuse paremaks iseloomustamiseks arvutati GENALEX programmiga mitmed geneetilised parameetrid. Geneetiline mitmekesisus oli saaremaa robirohul madalam kui rumeelia robirohul, mida tõestavad erinevad statistilised näitajad (tabel 5). Polümorfsete lookuste protsent populatsioonis (P) oli saaremaa robirohul peaaegu kaks korda madalam (keskmine 36%) kui rumeelia robirohul (keskmine 60%). Rumeelia robirohul oli keskmine alleelide arv lookuses ($A = 1,74$) samuti kõrgem kui saaremaa robirohul ($A = 1,46$).

Alleelisageduste järgi arvutati vaadeldud heterosügootsus H_o ja Hardy – Weinbergi tasakaalust tulenev eeldatud heterosügootsus H_e (tabel 5). Enamikul populatsioonidel oli vaadeldud heterosügootsus madalam kui seda võis oodata, lähtudes oletatavast allogaamsest paljunemisviisist. Saaremaa robirohu populatsioonides oli vaadeldud heterosügootsuse tase $H_o = 0,12$ ja eeldatud heterosügootsus oli $H_e = 0,37$. H_o ja H_e väärtuste suur erinevus näitab, et Hardy-Weinbergi tasakaal ei kehti ning populatsioonides esineb rohkem homosügootte. Rumeelia robirohu populatsioonides toimub peaaegu 100% ulatuses juhuslik võõrtolmlemine, sest vaadeldud ja eeldatud heterosügootsuse ($H_o = 0,33$ ja $H_e = 0,37$) vahe on tunduvalt väiksem.

Liigi *R. osiliensis* kõige madalam inbriidingukoefitsient oli Gotlandi populatsioonis ($F = -0,23$) ja kõige kõrgem väärtus Vahtrissoo, Odalätsi, Oiu ja Vesiku oja populatsioonides ($F = 1,00$) (keskmine $F = 0,72$). Liigi *R. rumelicus* kõige madalam $F = -0,80$ oli Anton populatsioonis ja kõige kõrgem $0,58$ oli Balvan Range populatsioonis (keskmine $F = 0,13$).

Risttolmlemise koefitsient t varieerus saaremaa robirohu populatsioonides nullist (Vahtrissoo, Odalätsi, Oiu, Vesiku oja), mis näitab täielikku isetolmlemist kuni väärtuseni $0,95$ Gotlandil, mis peegeldab võõrtolmlemise tugevat ülekaalu. Keskmine risttolmlemise koefitsient t oli $0,34$, näidates sellega ulatuslikku inbriidingut. Rumeelia robirohu t väärtus varieerus piirides $0,40$ (Anton) kuni $0,99$ (Dushantzi). Keskmine t väärtus $0,84$ näitab, et populatsioonides prevaleerib allogaamne paljunemisviis.

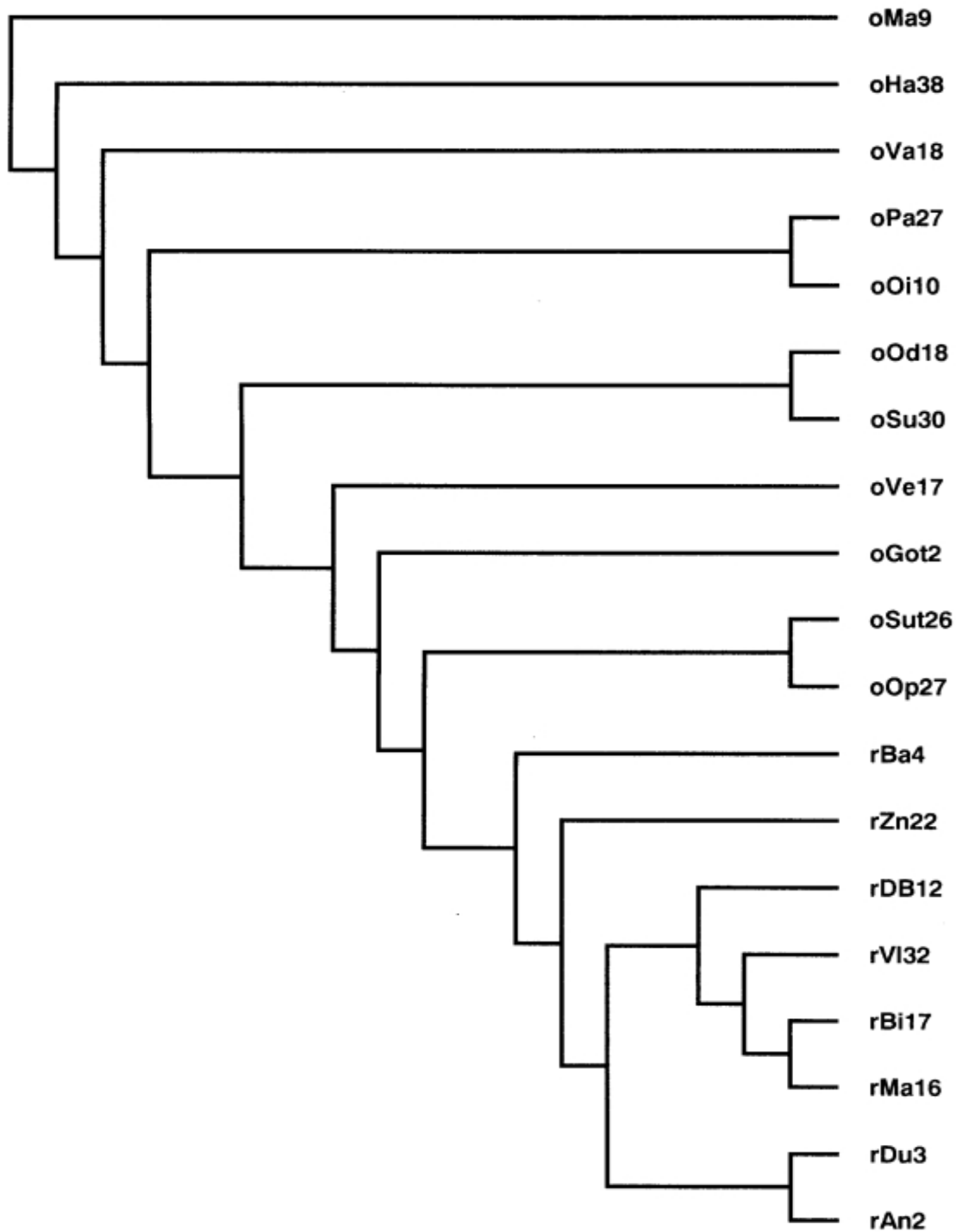
Tabel 5. Uuritud populatsioonide ja liikide polümorfsete lookuste protsent (P), keskmine alleelide arv lookuses (A) keskmine vaadeldud heterosügootsus (Ho), keskmine eeldatud heterosügootsus (He), inbriidungukoefitsient (F) ja risttolmlemise koefitsient (*t*). N on analüüsitud isendite arv.

	Populatsioon	N	P (%)	A	Ho	He	F	<i>t</i>
<i>R. osiliensis</i>	Marissoo	9	0,000	1,000	-	-	-	-
	Vahtrissoo	18	27,270	1,600	0,000	0,167	1,000	0,000
	Paatsasoo	27	45,450	1,455	0,250	0,375	0,333	0,889
	Odalätsi	18	27,270	1,375	0,000	0,449	1,000	0,000
	Oiu	10	18,180	1,250	0,000	0,320	1,000	0,000
	Vesiku oja	17	27,270	1,375	0,000	0,411	1,000	0,000
	Suurissoo	30	45,450	1,545	0,129	0,423	0,695	0,517
	Haavassoo	38	54,550	1,545	0,061	0,317	0,806	0,350
	Sutru	26	54,550	1,636	0,089	0,266	0,665	0,558
	Õpperaja soo	27	63,640	1,727	0,024	0,380	0,937	0,122
	Gotland	2	27,270	1,556	0,667	0,542	-0,231	0,947
	Keskmine:		35,540	1,460	0,122	0,365	0,721	0,338
<i>R. rumelicus</i>	Dospat Borino	12	72,730	1,444	0,208	0,349	0,404	0,837
	Dushautzi	3	45,450	1,818	0,400	0,411	0,027	0,999
	Anton	2	27,270	1,455	0,667	0,375	-0,779	0,393
	Balvan Range	3	45,450	1,364	0,200	0,478	0,582	0,661
	Bistvitza	16	63,640	1,636	0,304	0,402	0,244	0,940
	Znepole	18	81,820	2,000	0,263	0,298	0,117	0,986
	Vlenovik	32	72,730	2,091	0,220	0,276	0,203	0,959
	Mavchaevo	16	72,730	2,091	0,289	0,390	0,259	0,933
	Keskmine:		60,230	1,737	0,319	0,372	0,132	0,839

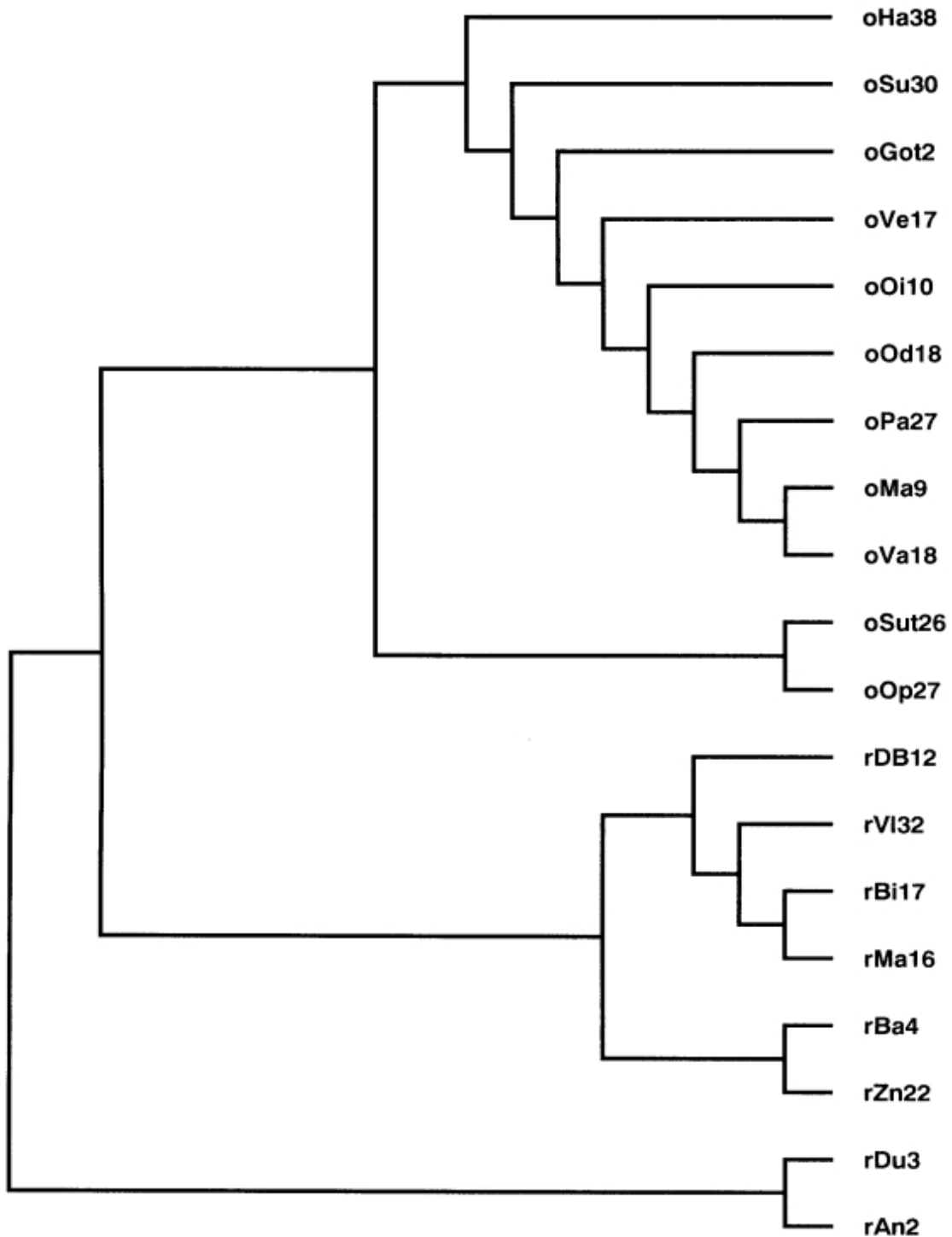
Uuritud liikide geneetilise diferentseerumise visuaaliseerimiseks teostati feneetiline klasteranalüüs binaarse isoensüümtunnuste andmematriksi alusel.

UPGMA meetodiga tehtud analüüs andis 31 sammu pikkuse puu (joonis 11). Dendrogrammil on näha kaks suuremat klastrit, mille vahel selgelt jaotusid liikide *R. osiliensis* ja *R. rumelicus* populatsioonid.

Lähima naabri meetodil saadud puul (joonis 10) moodustusid liikide *R. rumelicus* ja *R. osiliensis* populatsioonid samuti eraldi klastreid.



Joonis 10. Liikide *R. osiliensis* ja *R. rumelicus* populatsioonide lähima naabri meetodil klasteranalüüsi dendrogramm 28 allosüümtunnuse alusel. o – *R. osiliensis*; r – *R. rumelicus*. Populatsioonide tähised on näidatud tabelis 1 ja 2.



Joonis 11. Liikide *R. osiliensis* ja *R. rumelicus* populatsioonide UPGMA klasteranalüüsi dendrogramm 28 allosüümtunnuse alusel. o – *R. osiliensis*; r – *R. rumelicus*. Populatsioonide tähised on näidatud tabelis 1 ja 2.

7. Arutelu

Geneetiline mitmekesisus ja liikide eristumine

Haruldastel liikidel on tavaliselt madalam geneetiline mitmekesisus kui sama perekonna laialt levinud liikidel (Glover & Abbott 1995; Dodd & Helenurm 2002; Helenurm *et al.* 2005). Nende geneetilist mitmekesisust vähendavad erinevad faktorid, nagu näiteks geenitriiv, suunatud looduslik valik ning suur isetolmlemise osakaal väikestes populatsioonides (Karron 1991). Samas on haruldaste ja endeemsete liikide geneetilist struktuuri uurinud tööde tulemused väga erinevad. Mõni haruldane liik (Nickrent & Wiens 1989) näitas geneetilise mitmekesisuse kõrget taset - isegi kõrgemat, kui laialt levinud lähedane liik.

Võrreldes endeemse liigi *R. osiliensis* ja laialt levinud liigi *R. rumelicus* summaarset allosüümset varieeruvust (tabel 4), näeme, et saaremaa robirohul on madalam geneetiline varieeruvus. Liigi *R. osiliensis* populatsioonidest leiti 21 erinevat alleeli, samas kui *R. rumelicus* populatsioonides oli neid 27. Lisaks väiksemale alleelide arvule on saaremaa robirohul ka väiksem heterosügootide osakaal (*R. osiliensis* $H_o = 0,12$; *R. rumelicus* $H_o = 0,32$). Liigi *R. osiliensis* madalat heterosügootsuse taset võib seletada selle liigi seemnelevi mehhanismiga ja väikestest populatsioonidest tingitud inbriidinguga. Sarnast madalat geneetilist varieeruvust leidsid Ohkawa ja teised (2006) saare endeemsel liigil *Fagus multinervis* Nakai (Fagaceae).

Geneetilist mitmekesisust täpsemalt kirjeldavate indeksite võrdlus näitab, et *R. osiliensis* populatsioonides on väiksem polümorfsete lookuste protsent ja vähem alleele lookuse kohta, võrreldes *R. rumelicus* populatsioonidega. Saadud tulemused demonstreerivad, et saaremaa robirohu geneetiline mitmekesisus on isegi madalam, kui keskmine endeemide mitmekesisus ($P = 40,0\%$ ja $A = 1,80$) (Hamrick and Godt 1989). Seega, liigi *R. osiliensis* madal geneetiline varieeruvus on kooskõlas teoreetilise prognoosiga ning on võrreldav teiste endeemsete liikide geneetilise varieeruvusega. Näiteks, endeemne ning valdavalt isetolmlev liik *Primula scotica* näitas samuti väga madalat geneetilist varieeruvust (Glover and Abbott, 1995).

Tulemused näitasid kahe uuritud liigi märkimisväärset geneetilist eristumist

(tuvastatud kaheksa unikaalse liigispetsiifilise alleeli alusel).

Paljunemisviis

Kirjanduse põhjal (Eichwald 1960; Kwak 1978; Ducarme & Wesselingh 2005) on enamus perekonna *Rhinanthus* liikidest putuktolmlejad, kuid väikestes isoleeritud populatsioonides võib aset leida ka isetolmlemine (Ehrenfeld, 1976). Kuna robirohu liikidel ei ole erilisi vahendeid seemneleviks, siis seemnete kauglevi puudub ning enamus seemnetest idaneb emataimede läheduses. Piiratud seemnelevi põhjustab väikestes populatsioonides suuremat inbriidingut ja vähendab populatsioonisisest geneetilist mitmekesisust.

Saaremaa ja rumeelia robirohul ei ole tolmeldamist täpselt uuritud. Kodominantsed isoensüümtunnused on parim valik paljunemisviisi väljaselgitamiseks ja kvantitatiivseks iseloomustamiseks. Isoensüümtunnuste põhjal arvatud inbriidingu koefitsent ($F = 0,72$) ja temaga pöördvõrdeliselt seotud risttolmlemise koefitsent ($t = 0,34$) näitavad, et saaremaa robirohu populatsioonides prevaleerib isetolmlemine. Mõnes populatsioonis, nt. Vahtrisoos, Odalätsi, Oiu ja Vesiku oja oli $F = 1,00$ ning $t = 0$, mille põhjal võime väita, et populatsioonides leiab aset ainult isetolmlemine. Antud populatsioonid on uuritust kõige väiksemad, sisaldades alla 50 – 100 isendit. Teistes suuremates populatsioonides leiab vähesel määral aset ka risttolmlemine. Gotlandi populatsioonis leitud $F = - 0,23$ ja vastavalt $t = 0,95$ ei ole tõenäoliselt statistiliselt usaldusväärsed, kuna õnnestus analüüsida ainult kahte indiviidi. Populatsioonide keskmine inbriidingu koefitsent on 0,72 ja risttolmlemise koefitsent 0,39. Seega on liigil *R. osiliensis* valdavaks paljunemisviisiks isetolmlemine. Need tulemused on samuti kooskõlas teiste uurimustööde andmetega, mis näitavad et saarte endeemid on reeglina autogaamid (Barrett 1996).

Laia levikuga liigi *R. rumelicus* populatsioonide inbriidingu koefitsent on vahemikus 0,03 – 0,58 (keskmise 0,13). Välja on jäetud Antoni populatsiooni tulemused, sest kahe indiviidi uurimisel baseeruvad järeldused ei ole samuti statistiliselt usaldusväärsed. Rumeelia robirohu risttolmlemise koefitsent on 0,39 - 0,99 (keskmise 0,84). Sellest järeldub, et liigi *R. rumelicus* domineerivaks paljunemisviisiks on

võõrtolmlemine. Seega, liigipaari *R. osiliensis* ja *R. rumelicus* geneetilise varieeruvuse jaotus ühtib teoreetilise ennustusega endeemsete ja laia levikuga liikide geneetilise struktuuri kohta (Karron 1991; Gitzendanner & Soltis 2000).

Autopolüploidus

Polüploidus on katteseemnetaimede üks tähtsamaid evolutsiooni ja mitmekesisuse allikaid. Kõigist taksonitest rohkem kui 50% on arvatavasti polüploidse päritoluga (Grant 1981). Morfoloogiliste ja tsütoloogiliste andmete kõrval on geneetilised uuringud esmatahtsad, eristamaks liikide polüploiduse tüüpe (Roose & Gottlieb 1976; Soltis & Rieseberg 1986).

Polüploiduse võib jagada kaheks põhitüübiks: allopolüploidus ja autopolüploidus (Grant 1981). Allopolüploidus on erinevate liikide hübriidatsiooni tulemus. Koostisgenoomide suurte erinevuse tõttu on allopolüploididele iseloomulik disoomne pärilikkus ja fikseeritud heterosügootsus (Roose & Gottlieb 1976; Gottlieb 1981; Crawford 1983, 1985;). Autopolüploidus tekib ühe ja sama liigi sees tavaliselt redutseerumata gameetide liitumise tulemusena (Bretagnolle & Thompson 1995). Autopolüploide iseloomustab polüsoomne pärilikkus vastavalt tema ploidsuse tasemele ning tasakaalustatud ja ka tasakaalustamata heterosügootsus. Näiteks, kui autotetraploidi lookuses on esindatud kaks alleeli (A ja a), siis võib esineda kolme tüüpi heterosügootsust: tasakaalustatud heterosügootsus (AAaa) ja kahte tüüpi tasakaalustamata heterosügootsust (Aaaa ja AAAa) (Soltis & Rieseberg 1986). Autotetraploidi üks lookus võib peale dialleelse seisundi olla veel tri- või tetraalleelne.

Uuritud liikide fosfoglükoisomeraasi (PGI) lookuses leiti kokku neli erinevat alleeli (joonis 9). Liikide *R. osiliensis* ja *R. rumelicus* populatsioonides leidis tasakaalustatud heterosügootide kõrval tasakaalustamata heterosügoote. Lisaks sellele leiti liigi *R. rumelicus* isenditel tri- ja tetraalleelseid heterosügoote. Seega tõestab antud uurimustöö esmakordselt, et nii *R. osiliensis* kui *R. rumelicus* on autotetraploidid.

Taksonoomiline täpsustus

Tänapäeval käsitletakse saaremaa robirohtu nii eraldi liigina (*R. osiliensis*) kui ka rumeelia robirohu alamliigina (*R. rumelicus* subsp. *osiliensis*). Antud töö tulemused lubavad saaremaa robirohu taksonoomilist staatust täpsustada.

Rhinanthus osiliensis erineb mitme diskreetse morfoloogilise tunnusega liigist *R. rumelicus* (tabel 1). Saaremaa robirohi on oma kasvult rumeelia robirohust tunduvalt väiksem taim. Tal on kuni neli korda kitsamad varrelehed ning varrel on palju lühikesi sõlmevahesid (võrrelduna rumeelia robirohu pikkade vähearvukate sõlmevahedega). Seega eristab neid liike selge morfoloogiliste tunnuste hiaatus.

Isoensüümtulemused näitasid, et *R. osiliensis* ja *R. rumelicus* on ka geneetiliselt hästi eristunud. Mõlemal liigil esineb liigi - spetsiifilisi allelele ja feneetilise analüüsiga jaotusid uuritud populatsioonid eraldi klastritesse (joonis 10, joonis 11).

Kahe liigi vahel esineb geograafiline isolatsioon. *Rhinanthus osiliensis* on levinud Saaremaal, viimastel andmetel ka Gotlandil, *R. rumelicus* levilaks on Balkanimaad, Ungari ja Väike-Aasia (joonis 6). Kahe liigi levilad on teineteisest eraldatud ja looduses nad omavahel kokku ei puutu.

Lisaks on neil erinevad ökoloogilised nõudmised. *Rhinanthus osiliensis* kasvab lubjarikastes allikasoodes, vahel madalsoodes ning ojade ja kraavide kallastel, s.t. liigniisketes kasvukohtades. *Rhinanthus rumelicus* aga on niidutaim, eelistades kuivemaid kasvukohti.

Peale eelpool nimetatud erinevuste esineb uuritud kahe liigi vahel ka reproduktiivne barjäär. *Rhinanthus rumelicus* õitseb suve alguses (mais, juunis), aga *R. osiliensis* saavutab oma täisõitsengu juuli lõpus, augustis. Seda erinevust kinnitab ka ühesugustes tingimustes seemnete idanemise kiirus ja kasvatamine laboris. Rumeelia robirohu seemned idanesid kaks kuud varem kui saaremaa robirohu seemned, taimed olid elujõulised ja mõni isegi hakkas õitsema. Saaremaa robirohu seemned idanesid vaevaliselt, taimed olid nõrgad ja suremus oli suur. Lähtudes seemnete idanevuse erinevusest võis oletada, et *R. osiliensis* seemned kannatavad inbriidingdepressiooni all, mida nüüd on tõestatud ka geneetiliste tunnuste alusel.

Võttes arvesse morfoloogiliste tunnuste erinevused, geneetilise diferentseerumise,

reproduktiivse barjääri, geograafilise isolatsiooni ja erinevad ökoloogilised eelistused, võib väita, et *R. osiliensis* on selgelt piiritletud bioloogiline liik, mis väärib tunnustamist iseseisva taksonina.

Liigikaitse

Lähtudes liigi *R. osiliensis* tuvastatud madalast geneetilisest varieeruvusest ja autogaamse paljunemisviisi prevaleerimisest võib prognoosida liigi tulevikku ja üle vaadata rakendatavad kaitsemeetodid.

Pikaajalises perspektiivis kaotab fakultatiivselt autogaamne liik vähearvukates isoleeritud populatsioonides suurema osa oma geneetilisest mitmekesisusest ja kannatab tugeva inbriidingdepressiooni all, mis viib liigi vitaalsuse languseni ja lõpuks väljasuremiseni. Suurte populatsioonide puhul on prognoos tunduvalt parem. Mida suurem populatsioon, seda väiksem on erinevate faktorite koosmõju geneetilisele taustale ning stabiilsem populatsiooni seis.

Kõige rangema kontrolli ja kaitse alla tuleb võtta kõige suuremad populatsioonid (nt. Paatsasoo, Suurisoo, Sutru ja Haavassoo), mis on praegu geneetiliselt mitmekesised ja elujõulised. Väga väikeste populatsioonide säilitamine ei ole geneetilise mitmekesisuse seisukohalt nii oluline.

Kokkuvõte

Antud töö eesmärgiks oli uurida isoensüümtunnuste geneetilist mitmekesisust ja liikidevahelisi seoseid kahel liigil: saare endeemil *Rhinanthus osiliensis* ja temale lähedasel laia levikuga liigil *R. rumelicus*.

Geneetilise mitmekesisuse taseme kirjeldamiseks, polüploidisuse tüübi määramiseks ja paljunemisviisi selgitamiseks kasutati 11 isoensüümlookust 28 alleeliga.

Leiti, et geneetilise varieeruvuse tase on liigil *R. rumelicus* kõrge ja liigil *R. osiliensis* märkimisväärselt madal. Inbriidingu koefitsendi (F) ja risttolmlemise koefitsendi (t) järgi on *R. osiliensis* peamiselt autogaamne, *R. rumelicus* aga peaaegu täielikult allogaamne. Isoensüümfenotüüpide tetrasoomne pärilikkus ning allosüümide tasakaalustatud ja tasakaalustamata heterosügootide esinemine tõestab, et mõlemad liigid on autotetraploidid.

Meie tulemused on kooskõlas kirjanduses avaldatud uurimustöödega, mille järgi on saare endeemidel enamasti madalam geneetiline mitmekesisus võrreldes nende laialt levinud lähedaste liikidega.

Arvestades nende kahe liigi morfoloogilisi, geneetilisi ja kasvukoha erinevusi, geograafilist ning reproduktiivset isolatsiooni on ilmselge, et tegemist on kahe erineva bioloogilise taksoniga.

Haruldaste liikide populatsioonisisese ja –vahelise geneetilise mitmekesisuse mõistmine on liigikaitse seisukohalt kriitilise tähtsusega. Võttes arvesse *R. osiliensis* kitsalt piiritletud geograafilist levikut ja domineerivat isetolmlemist, võib see liik tulevikus kaotada oma geneetilist mitmekesisust. Geneetilise varieeruvuse vähenemine suurendab väljasuremise ohtu läbi lühiajalise kohasuse ja pikaajalise evolutsioonilise potentsiaali vähenemise. Seega, endeemse *R. osiliensis* kaitse peab kontsentreeruma suurtele populatsioonidele, mis on geneetiliselt varieeruvamad ja evolutsiooniliselt stabiilsemad.

Summary

Major aim of the present study was to investigate the isozyme diversity and relationships between two species: insular endemic *Rhinanthus osiliensis* and its widely distributed congener *R. rumelicus*.

Isozyme data of 11 loci and 28 alleles was used to describe the levels of genetic variation and discover polyploidy types and mating system in populations of the two species studied.

The observed levels of genetic variation were high in *R. rumelicus* and considerably low in *R. osiliensis*. Estimated values of fixation index (F) and outcrossing rate (t) indicated substantial autogamy in *R. osiliensis* and almost total allogamy in *R. rumelicus*. Isozyme banding patterns and segregation of isozyme variants into balanced and unbalanced heterozygosities suggest that the both species are autotetraploids displaying tetrasomic inheritance.

Our findings are in complete congruence with literature survey (Frankham 1998) results demonstrated that the insular endemic species is nearly always have a more low levels of genetic diversity than its mainland congener.

Taking into account the morphological and genetic differentiation, geographical and reproductive isolation and contrast habitat preference of the species studied, it is obvious that they comprise two distinct biological taxa.

Understanding the pattern of genetic variation within and among the populations of rare species is critical for prioritising populations for protection. Considering narrow geographic range and predominantly self-fertilisation in populations of *R. osiliensis*, this species may face a loss of genetic variation in future. Decrease of genetic diversity contributes to endangerment through reduction of short-term fitness and long-term evolutionary potential. Thus, protection of endemic *R. osiliensis* species has to concentrate on the largest populations that are genetically more variable and evolutionarily stable.

Tänuavaldused

Tänan oma juhendajaid Tatjana Oja ja Silvia Pihu. Lisaks tänan heade nõuannete eest Vello Jaaskat ja meeldiva koostöö eest laborante Kai Luike ja Ülle Aarnat.

Kasutatud kirjandus

Asenov, I. 1995. *Rhinanthus* L. In: Kuzuharov, St., Kuzmanov, B. (eds.) Flora Republicae Bulgaricae, tomum IX.

Barrett, S.C.H. 1996. The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 351: 725 – 733.

Barrett, S.C.H., Kohn, J.R. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size. In: Falk, D.A., Holsinger K.E. (eds.) Genetic and conservation of rare species. Oxford University Press, New York, USA. pp. 3 – 30.

Brown, A.H.D. 1990. Genetic characterization of plant mating system. In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir, B.S. (eds.) Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates, Inc, Sunderland. pp. 145 – 162.

Böhme, B. 2001. Neues über das isolierte Vorkommen von *Rhinanthus rumelicus* Velen. (Drüsiger Klappertopf) bei Jena. *Haussknechtia* 8: 85 – 92.

Chung, M.G. 1995. Low levels of genetic diversity within populations of *Hosta clausa* (Liliaceae). *Plant Species Biology*, 9: 177 - 182.

Crawford, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In: Tanksely, A.S.D., Orton, T.J. (eds.) *Isozymes in Plant Breeding*. Elsevier, Amsterdam. pp. 257 – 287.

Crawford, D.J. 1985. Electrophoretic data and plant speciation. *Syst. Bot.* 10: 405 – 416.

Crawford, D.J. 1989. Enzyme electrophoresis and plant systematics. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S. (eds.) *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Portland, OR. pp. 146 – 164.

Dodd, S.C., Helenurm, K. 2002. Genetic diversity in *Delphinium variegatum* (Ranunculaceae): a comparison of two insular endemic subspecies and their widespread mainland relative. *Amer. J. Bot.* 89: 613 – 622.

Ducarme, V., Wesselingh, R.A. 2005. Detecting hybridization in mixed populations of *Rhinanthus minor* and *Rhinanthus angustifolius*. *Folia Geobotanica* 40: 151 – 161.

Ehrenfeld, J. 1976. Reproductive biology of three species of *Euphorbia* subgenus *Chamaesyce* (Euphorbiaceae). *Amer. J. Bot.* 63: 406 – 413.

Eichwald, K. 1960. Saaremaa rohirohi (*Rhinanthus osiliensis*). Rmt-s: Trass, H. (toim.), Botaanika-alased tööd. Tartu Riikliku Ülikooli Toimetised, Tartu, 4: 22-30.

Ellstrand, N.C., Elam, D.R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 24: 217-242.

Evans, K.M., Ladiges, P.Y., Newbigin, E., Ades, P.K. 2001. Genetic variation in *Banksia saxicola* (Proteaceae), a rare Australian plant with a markedly disjunct distribution. *Pl. Syst. Evol.* 227: 105 – 115.

Frankel O.H., Brown, A.H.D., Burdon, J.J. 1995. The conservation of plant biodiversity. Cambridge: Cambridge University Press.

Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: island populations. *Conservation Biology* 12: 665 – 675.

Gitzendanner, M.A., Soltis, S. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany*, 87: 783-792.

Glover, B.J., Abbott, R.J. 1995. Low genetic diversity in the Scottish endemic *Primula*

scotica Hook. New Phytol. 129: 147-153.

Gottlieb LD. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. Progress in Phytochemistry 7: 1-46.

Grant, V. 1981. Plant speciation.-New York: Columbia University Press.

Hamrick, J., Godt, M. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A., Clegg, M., Kahler, A., Weir, B. (eds.) Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sinauer, Sunderland, MA. pp. 43-63.

Hamrick, J.L. 1989. Isozyme and the analysis of genetic structure in plant population. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S. (eds.) Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portland, Oregon. pp. 87-105.

Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Murawski, D.A., Loveless, M.D. 1991. Correlation between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk, D.A., Holsinger, K.E. (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York, USA, pp. 75 – 86.

Helenurm, K., West, R., Burckhalter, S.J. 2005. Allozyme variation in the endangered insular endemic *Castilleja grisea*. Annals of Botany, 95: 1221-1227.

Holsinger, K.E., Gottlieb, L.D. 1991. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: Falk, D.A., Holsinger, K.E. (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York, USA. pp. 195 – 208.

Huenneke, L.F. 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. In: Falk, D.A., Holsinger, K.E. (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York, USA. pp. 31 – 44.

Hultén E. ja Fries M. 1986. Atlas of North European vascular plants: North of the tropic of cancer. 2, Taxonomic index to the maps 997-1936.

Ivanina, I. 1981. *Rhinanthus* L. In: Flora Eurovpa CCCR. pp. 300 – 309.

Jaaska, V., Jaaska, V. 1984. isoenzymes of aromatic alcohol dehydrogenase in rye and triticale. Biochem. Physiol. Pflanz. 179: 21 – 30.

Jaaska, V., Jaaska, V. 1990. Isoenzyme variation in Asian Beans. Bot. Acta 103: 281 – 290.

Karron, J.D. 1991. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. In: Donald, A.F., Holsinger, K.E. (eds.), Genetics and Conservation of Rare Plants. Oxford University Press, new York, London, 87-98.

Kask, M. 1969. Perekond rohirohi – *Rhinanthus* L. Rmt - s: Eichwald, K., Eilart, J., Kalda, A., Kask, M., Paivel, A., Talts, S., Viljasoo, V. (toim.) Eesti NSV floora. Kirjastus Valgus, Tallinn. 4: 684-694

Kask, M., Lodzina, I., Jankevičiene, R. 1996. *Rhinanthus* L. In: Kuusk, V., Tabaka, L., Jankevičiene, R. (eds.) Flora of the Baltic countries. Eesti loodusfoto, Tartu, 2: 337-340.

Kukk T. ja Kull T. 2005: Eesti taimede levikuaatlas. Tartu.

Kukk, T. 1999. Eesti taimestik. Tartu-Tallinn, Teaduste Akadeemia Kirjastus.

Kukk. T. 2005. Eesti taimede kukuaabits. Kirjastus Varrak, Tallinn. pp. 240.

Kuusk, V. 1998. Soontaimed. Rmt-s: Lilleleht, V. Eesti punane Raamat. Eesti Teaduste Akadeemia Looduskaitse Komisjon. p. 60.

Kwak, M.M. 1978. Pollination, hybridization and ethological isolation of *Rhinanthus minor* and *R. serotinus* (*Rhinanthoideae: Scrophulariaceae*) by bumblebees (*Bombus latr.*). *Taxon* 27 (2/3): 145-158.

Lande, R. 1995. Mutation and conservation. *Conservation Biology* 9: 783 – 791.

Lindell, T. 2006. Finns öselskallra på Gotland? *Svensk botanisk tidskrift* 100 (4): 261 – 262.

Loveless, M.D., Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 15: 65 – 95.

Max, K.N., Mouchaty, S.K., Schwaegerle, K.E. 1999. Allozyme and morphological variation in two subspecies of *Dryas oxtopetala* (Rosaceae) in Alaska. *American Journal of Botany* 86 (11): 1637 – 1644.

Menges, E.S. 1990. Population viability analysis of an endangered plant. *Conservation Biology* 4: 52-62.

Newman, D., Tallmon, D.A. 2001. Experimental evidence for beneficial fitness effects of gene flow in recently isolated populations. *Conservation Biology* 15: 1054 – 1063.

Nickrent, D.L., Wiens, D. 1989. Genetic diversity in the rare California shrub *Dedeckera eurekaensis* (Polygonaceae). *Systematic Botany* 14: 245 – 253.

Ohkawa, T., Kitamura, K., Takasu, H., Kawano, S. 2006. Genetic variation in *Fagus multinervis* Nakai (Fagaceae), a beech species endemic to Ullung Island, South Korea. *Plant Species Biology* 21: 135 – 145.

Oja, T. 1999. Allozyme diversity and interspecific differentiation of the two diploid brome grass species, *Bromus tectorum* L. and *B. sterilis* L. (Poaceae). *Plant Biol.* 1: 679-

686.

Oja, T. 2002. Genetic divergence and interspecific differentiation in the *Bromus madritensis* complex (Poaceae) based on isozyme data. *Biochem, Syst. Ecol.* 30:433-449.

Oja, T. 2005. Isozyme evidence on the genetic diversity mating system and evolution of *Bromus intermedius* (Poaceae). *Pl. Syst. Evol.* 254: 199 – 208.

Oja, T., Paal, J. 2007. Multivariate analysis of morphological variation among closely related species *Bromus Japonicus*, *B. squarrosus* and *B. arvensis* (Poaceae) in comparison with isozyme evidences. *Nord. J. Bot.* 24 (6): 691 – 702.

Park, K. 2004. Comparisons of allozyme variation of narrow endemic and widespread species of Far East *Euphorbia* (Euphorbiaceae). *Bot. Bull. Acad. Sin* 45: 221 – 228.

Peakall, R., Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes.* 6, 288-295.

Reier, Ü. 1999. Sugukond mailaselised – *Scrophulariaceae*. Rmt – s: Krall, H., Kukk, T., Kull, T., Kuusk, V., Leht, M., Oja, T., Reier, Ü., Sepp, S., Zingel, H., Tuulik, T. (toim.), Eesti taimede määraja, Eesti Loodusfoto, Tartu.

Reitalu, M. 2003. *Rhinanthus rumelicus* Velen. Subsp. *Osiliensis* Ronniger & Saarsoo In: Rytteri, T., Kukk, Ü., Kull, T., Jäkäläniemi, A., Reitalu, M. (eds.) Monitoring of threatened vascular plants in Estonia and Finland – methods and experiences. pp. 48-53.

Ronniger, K. 1934. Auffindung einer neuen Rasse des *Rhinanthus rumelicus* Vel. Auf der Insel Ösel (Estland). *Fedde, Repertorium*, XXXV, 97-99.

Roose, M.L., Gottlieb, L.D. 1976. Genetic and biochemical consequences of polyploidy in *Tragopogon*. *Evolution* 30: 818 – 830.

Saarsoo, B. 1934. Uus robiheina liik *Alectrolophus rumelicus* (Velen.) Borbás Eesti floras. Eesti Loodus.

Soltis, D.E., Reisenberg, L.H. 1986. Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): genetic insights from enzyme electrophoresis. American Journal of Botany 73: 310-318.

Soó, R. v. 1929. Die mittel- und südosteuropäischen Arten und Formen der Gattung *Rhinanthus* und ihre Verbreitung in Südosteuropa.. Fedde, Repertorium, XXVI, 179-219.

Soo, R., Webb, D.A. 1972. *Rhinanthus* L. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Moore, D.M. (eds.) Flora Europaea 3. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 276 – 280.

Swofford, D.L. 2000. PAUP*4.0b8. Phylogenetic analysis using parsimony. Sinauer Associates, Sunderland.

Ter Borg, S.J. 2005. Dormancy and germination of six *Rhinanthus* species in relation to climate. Folia Geobotanica 40: 243 – 260.

Weir, B.S: 1990. Genetic data analysis. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Wendel, J.F., Weeden, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S. (eds.) Isozymes in Plant Biology, Dioscorides Press, Portland, Oregon. pp. 5-45.

Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. Annuals of Eurogenics 15: 323-354.

Lisad

		Rhinanthus osiliensis											Rhinanthus rumelicus							
Looku	All	Ma	Va	Pa	Od	Oi	Ve	Su	Ha	Sut	Op	Got	DB	Du	An	Ba	Bi	Zn	VI	Ma
PGI-B	3	-	-	0,375	-	-	-			0,111	0,167	0,250				0,167		0,056	0,031	0,188
	4	-	-	0,625	-	-	-	0,722	1,000	0,722	0,750	0,500	0,833	0,667	0,750	0,667	0,781	0,861	0,828	0,719
	5	-	-		-	-	-	0,222						0,333		0,167	0,031		0,109	0,031
	6	-	-		-	-	-	0,056		0,167	0,083	0,250	0,167		0,250		0,188	0,083	0,031	0,063
AAT-A	0	-	-						0,133	0,063	0,200									
	3	-	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,867	0,938	0,800	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AAT-B	2	-	-																0,395	
	3	-	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,605	1,000
AAT-C	0	-	-																0,053	
	3	-	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,947	1,000
PGM-B	3	-	-	0,250	-	-	-	0,800	0,500	1,000	0,700	0,750	0,750	0,042	0,833	0,750	0,875	0,500	0,500	0,758
	4	-	-	0,750	-	-	-	0,200	0,500		0,300	0,250	0,250	0,958	0,167	0,250	0,125	0,500	0,500	0,242
SKD-A	2											-	-							0,016
	3	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-	-	0,458			0,250	0,875	0,895	0,969
	4											-	-	0,542	1,000	1,000	0,750	0,125	0,105	0,016
SKD-B	2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-	-	0,375			0,250	0,875	0,895	0,875
	3											-	-	0,333	1,000	1,000	0,750	0,063	0,105	0,031
	4											-	-	0,292				0,063		0,094
PGD-B	1	-	-		-	-	-					0,250	0,250							
	2	-	-		-	-	-	0,300	0,119	0,900	0,100	0,500	0,500	0,292				0,344	0,158	0,938
	3	-	-	1,000	-	-	-	0,700	0,881	0,100	0,900	0,250	0,250	0,708	0,667	0,750	1,000	0,563	0,842	0,063

	4	-	-	-	-	-								0,333	0,250		0,094			
PRX-A	0		0,056	0,222	0,722	0,200	0,235	0,345	0,235	0,125	0,480			0,091			0,333	0,200	0,148	
	2	1,000	0,944	0,778	0,278	0,800	0,765	0,655	0,765	0,875	0,520	1,000	1,000	0,909	1,000	1,000	0,667	1,000	0,800	0,852
PRX-B	0		0,111	0,185	0,333		0,294		0,059	0,083	0,280			0,182	0,333	1,000		0,400	0,200	0,333
	4	1,000	0,889	0,815	0,667	1,000	0,706	1,000	0,941	0,917	0,720	1,000	1,000	0,818	0,667		1,000	0,600	0,800	0,667
PRX-C	0		0,111	0,259	0,500	0,800	0,647	0,483	0,441	0,417	0,320			0,273	0,333	1,000	0,333	0,600	0,800	0,667
	6	1,000	0,889	0,741	0,500	0,200	0,353	0,517	0,559	0,583	0,680	1,000	1,000	0,727	0,667		0,667	0,400	0,200	0,333

Lisa 1. Liikide *R. osiliensis* ja *R. rumelicus* alleelide sagedused 11 uuritud isoensüümlookuses. Populatsioonide nimed on lühendatud vastavalt tabelis 1 ja 2 näidatule. “-” tähendab, et tulemus puudub.