

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Botaanika õppetool

Kadri Kuusksalu

MORFOLOOGILINE JA GENEETILINE VARIEERUVUS PEREKONNA *GYMNADENIA*
EESTI POPULATSIOONIDES

Magistritöö

Juhendaja: vanemteadur Tatjana Oja

Tartu 2015

Sisukord

Sisukord	2
1.1 Perekond <i>Gymnadenia</i> üldiseloomustus	4
1.2. Eestis esinevad perekond <i>Gymnadenia</i> liigid.....	4
1.2.1 <i>Gymnadenia odoratissima</i> (L.) Rich.	4
1.2.2 <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R.Br.....	5
1.2.3 <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R.Br. ssp. <i>densiflora</i> (Wahlenb.) Dietrich	5
1.3. Liikide ökoloogia	6
1.4. Taksonite morfoloogilised erinevused	8
1.5. Taksonite geneetiline varieeruvus	10
1.6. <i>Gymnadenia conopsea</i> ssp. <i>conopsea</i> ja <i>G. conopsea</i> ssp. <i>densiflora</i> ploidsuse erinevused.....	12
1.7. Morfoloogiliste ja geneetiliste variatsioonide põhjused.....	12
2. Töö eesmärgid	14
3. Materjal ja meetodika	15
3.1. Välitööde meetodika	15
3.2. DNA eraldamine	18
3.3. Mikrosatelliitanalüüs	18
3.3.1. Praimerite optimeerimine ja PCR	19
3.3.2 Mikrosatelliitide fragmentanalüüs.....	21
3.4. Andmeanalüüsi meetodid	22
3.4.1. Morfomeetiline analüüs	22
3.4.2. Geneetiliste andmete analüüs	22
4. Tulemused	23
4.1. Morfoloogiline eristumine.....	23
4.2. Geneetiline varieeruvus ja eristumine	28
5. Arutelu	33
5.1. Taksonite morfoloogiline eristumine	33
5.2. Taksonite geneetiline varieeruvus ja eristumine	34
5.3. Taksonoomiline käsitlus.....	35
5.4. Ohustatus ja kaitse.....	35
Kokkuvõte	37
Summary	38
Tänu sõnad	39
Kasutatud kirjandus	40
Lisad	44

1. Sissejuhatus

Tänapäeva taimesüstemaatikas on geneetiliste andmete kasutamine saanud peaaegu asendamatuks mooduseks liikidevaheliste taksonoomiliste suhete selgitamisel. Sellest hoolimata vaid neist ei piisa ning geneetilise varieeruvuse uurimise kõrval jääb alati tähtsale kohale ka taimede morfoloogia tundmine, mis on liikide identifitseerimise aluseks. Taimeliikide ja nende taksonoomia korrektne tundmine, omab suurt tähtsust bioloogilise mitmekesisuse uurimisel ja säilitamisel.

Viimastel aastatel on mitmes Euroopa riigis teostatud uurimistöid selgitamaks perekonnas *Gymnadenia* esinevaid segaseid taksonoomilisi suhteid (Marhold et al 2005, Soliva & Widmer 1999, Stark et al 2011 jt). Peamiseks kitsaskohaks on *Gymnadenia conopsea* ssp. *conopsea* ja *Gymnadenia conopsea* ssp. *densiflora* vaheliste geneetiliste ja morfoloogiliste erinevuste selgitamine. Kesk-Euroopa populatsioonides on nende välisehituselt sarnaste taksonite vahel leitud selge geneetiline divergents. Taksonite morfoloogiliste erinevuste väljaselgitamiseks läbi viidud uuringud ei ole selgepiirilisi välisehituslikke tunnuseid tuvastanud, küll aga annavad geneetilised erinevused alust käsitleda neid kahe erineva liigilise taksonina (Campbell et al 2007, Gustafsson 2000, Marhold et al 2005, Soliva & Widmer 1999, Stark et al 2011, Trávníček et al 2012).

Kuna antud perekonda kuuluvate liikide ja alamliikide Eesti populatsioonide morfoloogiliste ja geneetiliste tunnuste varieeruvust ei ole varem uuritud, otsustasime selgitada välja perekonna *Gymnadenia* Eestis esinevate taksonite omavahelised suhted.

Käesoleva töö eesmärgiks on tuvastada taksonite *G. odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonidesisene ja taksonitesisene geneetiline varieeruvus ning geneetiline eristumine Eesti populatsioonides mikrosatelliitanalüüsi meetodil. Lisaks hinnata taksonite morfoloogilist varieeruvust ning morfoloogilist eristumist ning selgitada välja, kas taksonite vahelised morfoloogilised erinevused Eesti populatsioonides on piisavalt suured, et võimaldada nende eristamist looduses. Saadud tulemuste põhjal täpsustada *G. conopsea* ssp. *densiflora* taksonoomiline staatus.

1.1 Perekond *Gymnadenia* üldiseloomustus

Gymnadenia ehk käoraamat on kápaliste (*Orchidaceae*) sugukonda kuuluv perekond, mis koosneb umbes 20 Euroopas ja Aasia paraskliima-aladel levinud liigist (Pridgeon et al 1997). Eichwald jt (1984) on perekonda *Gymnadenia* kirjeldanud järgnevalt. Taimed on mitmeaastased, sõrmja juuremugulaga. Varrele kinnituvad lineaalsed või lineaalsüstjad renjad laikudeta lehed. Taimede lõhnavad õied on väikesed ja raotud ning moodustavad koos kandlehtedega tiheda, kitsa tähkõisiku. Välimised külgmised perigoonilehed on laiuvad, välimine keskmine ja sisemised külgmised moodustavad kiivri. Õied on kolmehõlmalise, allapoole suunatud huulega ning rulja või niitja kannusega. Günosteemium (orhideedel esinev keskne paljunemisorgan, mille moodustavad omavahel liitunud tolmukad ja sigimik) on lühike ja sirge. Tolmutterade tetraadid on polliiniumides üksteisega elastselt seotud, esineb keerdunud sigimik.

Perekonna ladinakeelne nimi on tulnud kreekakeelsetest sõnadest *gymnos* – paljas ja *aden* – nääre, taimede paljaste pollinaariumide järgi (Eichwald et al 1984).

1.2. Eestis esinevad perekond *Gymnadenia* liigid

1.2.1 *Gymnadenia odoratissima* (L.) Rich.

Gymnadenia odoratissima ehk lõhnava käoraamatu levik piirdub Euroopaga. Kui välja arvata piirkond Loode-Itaaliast Rumeeniani, kus liik on üsna levinud, esinevad populatsioonid suurte vahedega hajusalt (Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002). Eesti taimede levikuatlase (Kukk & Kull 2005) järgi, kus levikukaart on jagatud võrgustikuks, mille iga ruut on suurusega 6×10 minutit, on liiki aastatel 1971-2005 leitud 16 ruudus.

Kasvukohana eelistab *G. odoratissima* lubjarikkaid allikasoid ja soiseid niite (Eichwald et al 1984). Eestis on *G. odoratissima* II kategooria kaitsealune liik, vastavalt IUCN kategooriatele ohualdis ning peamisteks ohuteguriteks on soode kuivendamine ja turba võtmine (Eesti Punane Raamat 2008). *G. odoratissima* arvukuse trend Eestis on vähenev (Eesti Punane Raamat 2008).

Taimed on 25-40 cm kõrged, väikeste kahvaturossade kuni punakas- või roosakasviolettjate õitega, mis vanemaks saades muutuvad valkjaks (Eichwald et al 1984, Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002). Lühikeses kannuses sisalduv nektar meelitab ligi taime õisi tolmeldavaid ööliblikaid (Van der Cingel 2001). Eichwald jt (1984) järgi õitseb *G. odoratissima* Eestis

juuni lõpul ja juulis. Võrdluseks on märksa lõunapoolsemates Šveitsi populatsioonides taimede õitsemisaeg juunist augusti keskpaigani (Reinhard et al 1991) Õitel on tugev vanillilõhn, millele viitab ka liigiepiteet *odoratissima* (ülivõrre sõnast *odorata* (lad k) – lõhnav) (Eichwald et al 1984).

1.2.2 *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br.

Gymnadenia conopsea ehk hariliku käoraamatu leviala ulatub Skandinaaviast Vahemerealadeni ning Suurbritanniast Hiina ja Jaapanini (Marhold et al 2005). Euroopas veel üsna tavaline käpeline kasvab liigirikastel niitudel ja puisniitudel, eelistades lubjarikast, võrdlemisi niisket või soostunud mulda (Eichwald et al 1984, Stark et al 2011). Samuti võib liiki leida segametsa sihtidel ja metsalagendikel, siirdesoometsades, rabaservades, soodes, jõeluhtadel ja kadastikes (Eichwald et al 1984). Eestis on liik levinud sobivatel kasvukohtadel kõikjal, kuid on sagedam lääne pool (Eichwald et al 1984). *G. conopsea* on III kategooria kaitsealune liik ning Eesti ohustatud liikide punase nimestiku andmetel ohuväline (Eesti Punane Raamat 2008).

Taimed on umbes 30-50 cm kõrged. Õite värv varieerub punakasvioletjast valkjani (Eichwald et al 1984). Eesti populatsioonides õitsevad taimed juuni teisest poolest augusti alguseni (Eichwald et al 1984), Šveitsi populatsioonide puhul on õitsemisajaks märgitud mai ja juuni (Reinhard et al 1991). Taimi tolmeldavad eri liiki päeva- ja ööliblikad, keda meelitavad ligi rohkelt nektarit sisaldavad õied (Gustafsson 2000). Liigi lai levik on tinginud ka väga kõrge liigisisese varieeruvuse ning sellest tulenevalt on kirjeldatud mitmeid alamliike ja varieteete (Delforge 2006).

Liigiepiteet *conopsea* tuleneb kreekakeelsest sõnast *konops* – sääsk, mis iseloomustab taime õie kuju.

1.2.3 *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. ssp. *densiflora* (Wahlenb.) Dietrich

Taksonit *Gymnadenia conopsea* ssp. *densiflora* ehk tihedaõielist käoraamatut käsitletakse klassikaliselt *G. conopsea* alamliigina. Kuigi suure morfoloogilise varieeruvuse tõttu võib antud taksonite selge eristamine looduses osutada keeruliseks (Marhold et al 2005), on viimaste aastate uurimistöde tulemuste alusel tehtud ettepanek käsitleda taksoneid *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* kahe erineva liigina.

Andmed *G. conopsea* ssp. *densiflora* leviku kohta Eestis on üldiselt puudulikud (Kukk & Kull 2005) ning sarnasele teabe puudumisele Euroopa tasemel viitab ka Marhold jt (2005) töö, kus

Kesk-Euroopa levikuandmete osas tugineti suuresti vaid herbaariumide infole ja autori enese vaatlustele.

Taimed on tugeva haabitusega, kõrgekasvulised (kuni 75 cm), tavaliselt laiemate lehtede, tihedama ja suurema õisiku ning veidi suuremate, punakamate ja lühema kannusega õitega kui *G. conopsea* ssp. *conopsea* (Campbell et al 2007, Eichwald et al 1984). On märgitud, et *Gymnadenia conopsea* ssp. *densiflora* õitsemisaeg on hilisem kui *G. conopsea* ssp. *conopsea* õitsemisaeg. Šveitsi populatsioonides on *Gymnadenia conopsea* ssp. *densiflora* õitsemisajaks märgitud juuli ja august ning *G. conopsea* ssp. *conopsea* õitsemisajaks mai ja juuni.

1.3. Liikide ökoloogia

G. odoratissima, *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* kasvukohaelistused on võrdlemisi sarnased ning neid esineb lubjarikkal mullal nii madalatel absoluutkõrgustel kui ka subalpiinsetel aladel kuni 2600 m kõrgusel merepinnast. Kuigi kõik kolm taksonit võivad sageli ka ühes leiukohas esineda, on looduslikes populatsioonides täheldatud üsna vähest hübriidiseerumist (Schiestl & Schluter 2009, Sun et al 2015, Reinhard et al 1991). Perekonda *Gymnadenia* kuuluvaid käpalisi tolmeldavad peamiselt nii öise kui päevase eluviisiga lühikese- ja pikasuiselised liblikalised (*Lepidoptera*) (Huber et al 2005, Sun et al 2014, Vöth 2000). On leitud, et *G. odoratissima* taimi tolmeldatakse 29 erineva perekonna liikide poolt, kes kuuluvad nelja funktsionaalsesse gruppi (päevaliblikad, ööliblikad, mardikalised ja kahetiivalised) ning *G. conopsea* ssp. *conopsea* taimi tolmeldatakse ligikaudu 42 erineva perekonna liikide poolt, kes kuuluvad kolme funktsionaalsesse gruppi (päevaliblikad, ööliblikad ja mardikalised) (Vöth 2000).

Sun jt (2015) uurisid oma töös *G. odoratissima* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea* vahelist reproduktiivset isolatsiooni ja leidsid, et uuritud populatsioonides toimus õietolmu ülekande taimede vahel vaid liigisiselt, ühtki liikidevahelist õietolmuülekande juhtu ei täheldatud. Selline tulemus ühtib juba varasemate töödega autoritelt Vöth (2000) ning Huber jt (2005), kus samuti ei leitud mingit kattuvust kahe liigi tolmeldajate vahel. Kuna autogaamia (isetolmlemine ühe õie piires) ja geitonogaamia (sama taime teise õie või sama klooni õietolmuga viljastamise) sagedus perekonnas *Gymnadenia* on umbes 50%, võib oletada, et taimede reproduktiivses isolatsioonis mängivad võrdset rolli nii autogaamia ja geitonogaamia kui ka tolmeldajate liigitruudus (Gross & Schiestl 2015, Sun et al 2015). Kuna *G. odoratissima* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea* on morfoloogiliselt ja geneetiliselt üsna sarnased (Soliva & Widmer 1999; Bateman et al. 2003), nende õitsemisajad on osaliselt kattuvad

(Eichwald et al 1984, Reinhard et al 1991) ning nad esinevad sageli ka sümpaatrilistes populatsioonides, kus esimese põlvkonna hübriide leidub vähe, võib eeldada, et just presügootse isolatsiooni mehhanismid hoiavad neid kaht liiki reproduktiivselt lahus (Schiestl & Schluter 2009, Huber et al 2005). Suurimat osa kahe liigi vahelises reproduktiivses isolatsioonis mängivad õieomaduste erinevused – õite lõhn, värv ja morfoloogia (Schiestl & Schluter 2009, Sun et al 2015). Taimede õite omadustest tulenev etoloogiline isolatsioon võib tekkida juhul, kui taimede õieehitus on erinev ja neid tolmeldavad erinevad putukaliigid või kui tolmeldajal on välja kujunenud eelistused ja/või järjepidevus mingi kindla õietüübi suhtes (Grant 1994). Usutavasti on just tolmeldajate adaptatsioonid nende käpaliste puhul peamiseks liigitekke mootoriks (Sun et al 2015).

Perekonna *Gymnadenia* liikide õied sisaldavad nektarit ja lõhnavad tugevalt nii öösel kui päeval (Stpiczyńska 2001). Lõhna emiteeritakse õie huule ja külgmiste perigoonilehtede pinnalt (Stpiczyńska 2001). Erinevad lõhnakomponendid, eritatuna kas öösel või päeval, võivad meelitada või peletada erinevaid putukaid (Huber et al 2005, Junker & Blüthgen 2010). Lisaks mõjutab tolmeldajate käitumist ka lõhnade kvantitatiivne variatsioon (Huber et al 2005). *Gymnadenia conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. odoratissima* emiteeritavate lõhnade koostist on uuritud gaaskromatograafia meetodil (Huber et al 2005, Sun et al 2015). Huber jt (2005) määrasid kokku 51 koostisainet, millest 45 võib leida *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja 44 *G. odoratissima* puhul. Suur oli koostisosade liikidevaheline kattuvus - mõlemale liigile omaseid aineid leiti 38 (Huber et al 2005). Sun jt (2015) identifitseerisid oma töös 31 erinevat lõhnakomponenti. Huber jt (2005) analüüsisid ka *G. odoratissima* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea* tolmeldajate reaktsioone identifitseeritud ainetele – kaheksa erinevat komponenti kutsus esile vastuse putukate närvireseptorites. (kolm *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja seitse *G. odoratissima* poolt, neist vaid kaks, eugenool ja bensüülatsetaat, olid mõlemal liigil esinevad ühendid). Füsioloogiliselt aktiivsetest koostisosadest seitse olid bensenoidid ja üks (eugenool) kuulus fenüülpropanoidide rühma (Huber et al 2005). Kõik kaheksa komponenti olid ka kõige ohtramalt esindatud ained analüüsitud proovides (Huber et al 2005).

Erinevusi taimede poolt eritatava lõhna komponentides leidsid ka Gupta jt (2014). Oma töös uurisid nad eugenooli ja isoeugenooli sünteesi *G. odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* taimedel ning leidsid, et kui *G. odoratissima* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea* ensüümid katalüüsivad vaid eugenooli sünteesi, siis *G. conopsea* ssp. *densiflora* valgud sünteesivad nii eugenooli kui isoeugenooli (Gupta et al 2014).

Huber jt (2005) leidsid, et *G. odoratissima* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea* emiteerivad öösel ja päeval erinevates kogustes lõhna. Mõlema liigi puhul oli emiteeritava lõhna kogus nii ühe õie

kui ka terve õisiku kohta öösel märgatavalt madalam kui päeval (Huber et al 2005). Samuti muutusid füsioloogiliselt aktiivsete koostisosade suhtelised kogused vastavalt sellele, kas oli päev või öö (Huber et al 2005).

On näidatud, et kuigi *G. odoratissima* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea* taimedel ei ole oluliselt erinev õite arv, on *G. conopsea* ssp. *conopsea* tolmlemiesedukus kõrgem (hinnatud viljade arvu põhjal) (Huber et al 2005). Mõlema liigi puhul korreleerus suhteline tolmlemiesedukus positiivselt õite arvuga taime õisikus (Huber et al 2005).

1.4. Taksonite morfoloogilised erinevused

Gymnadenia odoratissima võib esineda koos taksonitega *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora*, kuid enamasti on *G. odoratissima* taimed lihtsasti eristatavad oma lühema (2,7-3,7 mm), tõmbitipulise kannuse (*G. conopsea* kannus on teravatipuline 12-15 mm pikk) ja heledama õievärvi järgi (Eichwald et al 1984, Soliva & Widmer 1999). Samuti on taimed tavaliselt väiksemakasvulised ning kui *G. conopsea* ssp. *conopsea* (ja ka *G. conopsea* ssp. *densiflora*) õisiku läbimõõt jääb 1,6-3,2 cm vahele, ei ületa *G. odoratissima* õisiku läbimõõt tavaliselt 1,5 cm (Eichwald et al 1984). Liigile *G. odoratissima* on iseloomulikud õise aktiivsusega tolmeldajaid meelitavad õie omadused – valged kuni väga erksad purpur-violetsed õied ja tugev lõhn (Van der Cingel 2001).

Kui *G. odoratissima* eristamine reeglina probleeme ei tekita, ei saa sama väita *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahelise piiri tõmbamisel. Selle kitsaskoha lahendamiseks on läbi viidud mitmeid uurimistöid, et luua selgust antud taksonite morfoloogilises varieeruvuses ja lihtsustada liikide määramist.

Soliva ja Widmer (1999) analüüsisid oma töös *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* geneetilise varieeruvuse kõrval ka liikide morfoloogilisi tunnuseid. Töös ei käsitleta taksoneid eri liikidena – *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* olid eristatud kui *G. conopsea* s.l. vastavalt vara ja hilja õitsevad alamliigid. Õieparameetritest mõõdeti kannuse pikkust, kandlehe pikkust, sigimiku pikkust ja erinevaid huuleparameetreid. Vegetatiivsetest omadustest olid vaatluse all taime kõrgus, lehtede arv, õisiku pikkus ja õite arv. Morfomeetiline analüüs näitas, et õie parameetrid varieerusid nii populatsioonide ja alamliikide siseselt kui vaheliselt, kuid selget trendi, mis kaht alamliiki eristada lubaks, ei leitud. Nõrka lahknemist alamliikide vahel võis vaadelda küll vegetatiivsete parameetrite analüüsimisel, kuid eeldatavasti peegeldas see vara ja hilja õitseva alamliigi kasvukoha ja konkurentsi erinevusi.

2005. aastal viisid Marhold jt läbi detailse uuringu, kus analüüsisid *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* karüoloogilisi ja morfoloogilisi erinevusi. Taimede morfoloogilistest karakteristikutest võrreldi isendite kõrgust, taime kõrguse suhet kaugusega varre alusest kõige kõrgemal asetseva tupega lehe aluseni, alt teise lehe maksimaalset laiust, tupeta lehtede arvu, õite arvu õisikus, huule laiust, õie pikkuse ja laiuse korrutist (kirjeldab õie suurust) ning õisiku tihedust (õite arvu ja õisiku pikkuse suhe). Erinevad morfomeetriselised analüüsid näitasid antud töös selget liikide eristumist välisehituslike tunnuste alusel.

Marhold jt (2005) töös oli mitmeid morfoloogilisi tunnuseid (näiteks taime kõrgus ja õite arv), mille võrdlus toetas tugevalt *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* eristamist, mis aga eelnevalt käsitletud Soliva ja Widmer (1999) töös vaid nõrgalt liikide lahknemist väljendasid. Asjaolu, et mõõdeti samu suurusi, lubab antud töid mõneti võrrelda, küll aga tuleb juhtida tähelepanu faktile, et Marhold jt (2005) töös analüüsiiti nii varase kui hilise õitsemisajaga *G. conopsea* ssp. *conopsea* taimi, Soliva ja Widmer (1999) uuritud populatsioonides hilise õitsemisajaga *G. conopsea* ssp. *conopsea* taimi ei olnud, kõik hilise fenoloogiaga taimed olid määratud kui *G. conopsea* ssp. *densiflora*.

Stark jt (2011) analüüsisid oma töös kokku 626 *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* taime geneetilisi ja morfoloogilisi erinevusi. Neist 372 isendit oli pärit Ida-Saksamaa populatsioonidest (173 *G. conopsea* ssp. *densiflora* taime, 199 *G. conopsea* ssp. *conopsea* taime) ja 254 Põhja-Saksamaa populatsioonidest (kõik *G. conopsea* ssp. *conopsea* taimed). Mõõdeti parameetreid, mida reeglina kasutatakse ka antud taksonite määramisel: taime kõrgus, õisiku pikkus, õite arv, õisiku tihedus (õite arvu ja õisiku pikkuse suhe), lehtede arv, alt teise lehe pikkus ja maksimaalne laius, õie kannuse ja sigimiku pikkus (õie parameetrid mõõdeti õisiku keskosas asuvatel õitel, vaid 30 populatsioonis). Statistiliselt olulisi erinevusi liikide vahel leiti seitsmel morfoloogilisel tunnusel üheksast. *G. conopsea* ssp. *densiflora* oli üldiselt suurem ja omas kõrgemaid väärtusi taime kõrguses ($p < 0,01$), lehtede arvus ($p < 0,001$), lehtede pikkuses ($p < 0,01$), lehtede laiuses ($p < 0,001$), õite arvus ($p < 0,001$) ja õisiku tiheduses ($p < 0,001$), aga oli lühema kannusega ($p < 0,01$) kui *G. conopsea* ssp. *conopsea*. Suurim suhteline erinevus leiti õite arvus ja õisiku tiheduses ning lehtede arvus ja laiuses. Regioonidevaheliselt leiti *G. conopsea* ssp. *conopsea* puhul vaid väikesed erinevused taime kõrgustes ($p = 0,05$) ja lehe pikkustes ($p = 0,02$). Morfoloogiliselt erinesid taksonid selles töös selgesti mitme diagnostilise tunnuse keskvaartuse poolest, kuid läbiviidud diskriminantanalüüs näitas, et üheti mõistetav määratlemine pole siiski võimalik, kuna 96% *G. conopsea* ssp. *conopsea* taimedest ja vaid 77% *G. conopsea* ssp. *densiflora* taimedest klassifitseerusid analüüsi käigus õigesse taksonisse.

Kuigi mitmed *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* morfoloogilised omadused lubavad võrdlemisi selget liikide eristamist, esineb nende puhul märkimisväärne varieeruvus, mis sageli takistab ühest liigi määramist. Samuti teeb liikide määramise keeruliseks mõningane liikidevaheline hübriidiseerumine (Trávníček et al 2012).

1.5. Taksonite geneetiline varieeruvus

Geneetilise mitmekesisuse tase ja muster mõjutab tugevalt populatsioonide pikaajalist püsijäämist, seega on nii haruldaste kui tavaliste liikide säilimiseks vajalik tunda nende geneetilist tausta. Kuna allosüümid väljendavad sageli madalalt liigisisest varieeruvust, kasutatakse tihti mikrosatelliit-markereid liigisisese polümorfismi tuvastamiseks. Ka perekonna *Gymnadenia* geneetilise varieeruvuse selgitamiseks on palju kasutatud just mikrosatelliite.

Haruldase liigi *G. odoratissima* geneetilist mustrit on võrreldud laiemalt levinud *G. conopsea* ssp. *conopsea* geneetilise mustriga. ITS (ingl k *internal transcribed spacer* – sisemine transkribeeritav speisser) regiooni võrdluses on leitud, et *G. odoratissima* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea* omavad identseid järjestusi ja ei ole seega antud regiooni põhjal eristatavad (Gustafsson & Lönn 2003). Seesugune sarnasus viitab liikide väga lähedasele sugulusele (Gustafsson & Lönn 2003).

Mikrosatelliit-analüüsil on leitud, et kui *G. odoratissima* taimede mikrosatelliit-lookused on sama pikkusega kui *G. conopsea* ssp. *conopsea* taimede puhul, on nii eriomaste alleelide arv kui ka heterosügootsus-aste *G. odoratissima* puhul madalamad (Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002). Selline tulemus viitab haruldase *G. odoratissima* madalale liigisisesele varieeruvusele ning (Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002). Gustafsson ja Sjögren-Gulve (2002) töös võrreldi viie *G. odoratissima* Rootsi populatsiooni geneetilist varieeruvust *G. conopsea* ssp. *conopsea* populatsioonide geneetilise varieeruvusega. *Gymnadenia odoratissima* puhul leiti madal geneetiline varieerumine populatsiooni siseselt ja kõrgem populatsioonide vaheliselt (Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002). Erinevalt *G. conopsea* ssp. *conopsea* populatsioonidest on *G. odoratissima* Rootsi populatsioonid olnud fragmenteerunud juba pikka aega ning liigi levikus on toimunud vaid väikseid muutusi (Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002). Kõrge populatsioonidevahelise varieeruvuse tekkimisele *G. odoratissima* üksteisest kaugel asuvate populatsioonide vahel on tõenäoliselt kaasa aidanud geenitriiv ja mutatsioonid (Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002). Laiemalt levinud ja üksteisele lähemal asuvate *G. conopsea* ssp. *conopsea* populatsioonide vahel leiti seevastu palju homogeensem geneetiline muster

(Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002). *Gymnadenia conopsea* ssp. *conopsea* kõrget geneetilist varieeruvust populatsioonide siseselt ja madalat geneetilist varieeruvust populatsioonide vaheliselt näitas ka Gustafsson oma 2000. aasta töös. Madal geneetiline varieerumine *G. odoratissima* populatsioonide siseselt ja inbriiding on ilmselt põhjustatud sellest, et populatsioonid on tihti üsna väikesed (Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002).

G. conopsea ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahelist geneetilist variatsiooni on kirjeldatud erinevates töödes cpDNA, ITS-regiooni, mikrosatelliit-markerite ja teiste näitajate uurimisega ning tuvastatud kahe taksoni märkimisväärne erinevus, mis lubab neid käsitleda eraldi liikidena (Campbell et al 2007, Gustafsson 2000, Marhold et al 2005, Soliva & Widmer 1999, Stark et al 2011, Trávníček et al 2012).

ITS-regiooni järjestuste analüüs on näidanud 2% suurust geneetilist divergentsi Kesk-Euroopa *G. conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonide vahel, mis on sarnane tavalisele geneetilisele divergentsile teiste perekonna liikide seas (Stark et al 2011). Stark jt (2011) näitavad oma töös, et ITS-regiooni järjestuste põhjal moodustab *G. conopsea* ssp. *densiflora* kõrgete toetushinnangutega monofüleetilise grupi, mis jagab ühist hiliseimat esivanemat liikidega *G. nigra* (L.) Wettst-Kohlroschen ja *G. austriaca* (Teppner & E.Klein) P. Delforge. Seega ei ole *G. conopsea* ssp. *densiflora* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea* vaatamata oma morfoloogilisele sarnasusele isegi mitte sõsarliigid (Stark et al 2011). Samas leidsid Stark jt (2011) sarnaselt Gustafssoni ja Lönni (2003) tööle, et morfoloogiliselt erinevaid taksonid *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. odoratissima* ei ole võimalik ITS-järjestuste alusel eristada. Stark jt (2011) ITS-regiooni järjestuste põhjal koostatud fülogeneesipuud toetab ka samas töös läbi viidud mikrosatelliit-markerite analüüs – suur hulk mittekattuvaid alleelide komplekte väljendas tugevat geneetilist erinevust *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahel.

G. conopsea ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* geneetilist erinevust kinnitab lisaks ka Campbell jt 2007. aastal läbi viidud uurimistöö Briti saartel. Mikrosatelliit-markerite analüüsimisel näidati *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* jagunemist kahte geneetiliselt selgelt eristuvasse gruppi (Campbell et al 2007). Üldine alleelide rikkus oli kõrge, kuid töös leiti, et ükski populatsioon ei ühtinud Hardy–Weinberg'i tasakaaluga – näidati üldist homosügootide liigsust ja heterosügootide nappust (Campbell et al 2007). Seejuures võis aga *G. conopsea* ssp. *conopsea* puhul jälgida suuremat alleelide rikkust ja märgatavalt kõrgemat heterosügootsus-astet kui *G. conopsea* ssp. *densiflora* puhul (Campbell et al 2007). Campbell jt (2007) leitud erinevused kahe taksoni vahel võivad peegeldada

erinevusi antud töös käsitletud populatsioonide suurustes, mis olid *G. conopsea* ssp. *conopsea* puhul umbes kümme korda suuremad kui *G. conopsea* ssp. *densiflora* puhul.

Kõigi kolme taksoni puhul on täheldatud ka kõrgeid inbriidingu näitajaid (Campbell et al 2007, Gustafsson & Sjögren-Gulve 2002).

1.6. *Gymnadenia conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* ploidsuse erinevused

Marhold jt (2005) töös selgus, et taimed, kes morfoloogia alusel määrati taksonisse *G. conopsea* ssp. *densiflora*, olid alati diploidsed ($2n=40$), seevastu morfoloogia põhjal taksonisse *G. conopsea* ssp. *conopsea* määratud taimed olid kas diploidsed ($2n=40$) või tetraploidsed ($2n=80$) ning üks taim isegi pentaploidse ($2n=100$) kromosoomistikuga.

Sarnase tulemuse said Stark jt (2011), kes hindasid ploidsustaset peamiselt mikrosatelliit-analüüsi tulemuste järgi: kõik analüüsitud *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonid Prantsuse Alpideest Rootsini olid diploidsed ja *G. conopsea* ssp. *conopsea* populatsioonid kas diploidsed, tetraploidsed või segatud ploidsusega. Stark jt (2011) töös esines *G. conopsea* ssp. *conopsea* ploidsusandmetes ka geograafiline muster, kus kõigis Rootsi populatsioonides leiti vaid diploide, Ida- ja Põhja-Saksamaal vaid tetraploide ja mõlemaid ploidsustasemeid Prantsusmaa populatsioonides.

Trávníček jt (2012) näitavad oma laiaulatuslikus töös, et *G. conopsea* ssp. *conopsea* võib olla di-, tri-, tetra-, penta- ning isegi heksaploidne. Levinuimaks jääb siiski diploidsus. Tetraploidsus (ja polüploidsus üldiselt) oli esindatud enamasti Euroopa lõunapoolsetes piirkondades ning näis puuduvat Põhja-Euroopas, mida näitas asjaolu, et kõik analüüsitud Rootsi, Eesti ja Venemaa populatsioonid olid diploidsed (Trávníček et al 2012).

1.7. Morfoloogiliste ja geneetiliste variatsioonide põhjused

Orhideed on obligatoorselt seotud mükoriisete seentega, kelle olemasolust sõltub taimede idanemine (Swarts & Dixon 2009). Seenpartneri olemasolu võib määrata kas teatud kasvukoht on taimele sobilik ning seeläbi mõjutada liikide levikut (Swarts & Dixon 2009). Mükoriisal võib olla ka tugev mõju näiteks taime kasvule, veel enam – isegi sama perekonna erinevad seeneliigid võivad taime morfoloogiale erinevat mõju avaldada (Lee 2002). Oletatakse, et kuna *Gymnadenia* liigid on seotud paljude erinevate seenetaksonitega, võib nii üldine sarnasus liikide vahel, kui ka morfoloogiline varieerumine liikide siseselt, tuleneda

vastavalt kas interaktsioonidest samade mükoriisete seentega või vastupidi sümbioosist erinevate seenetaksonitega (Stark et al 2011). Nii *G. conopsea* ssp. *conopsea* kui ka *G. conopsea* ssp. *densiflora* õied on üsna spetsialiseerunud: need toodavad nektarit ja neid tolmeldavad samasse taksonisse kuuluvad ööliblikad (Stark et al 2011). Seega oletatakse, et taimede sarnane õiemorfoloogia võib olla põhjustatud tolmeldajate valikust (Stark et al 2011). Geneetilist struktuuri mõjutavad kõige enam paljunemiseärasused ning seemnete ja õietolmu levik (Gustafsson 2000). Reproduktiivne barjäär *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahel nende segapopulatsioonides usutakse olevat tekkinud nii erinevate õieomaduste (näiteks erinevate lõhnakomponentide), kui ka taimede õitsemise tippaja erinevuste tõttu (Gupta et al 2014, Huber et al 2005, Soliva & Widmer 1999, Sun et al 2015). Tolmeldajate käitumisega usutakse aga seotud olevat tihti esinevad kõrged inbriidingu väärtused (Campbell et al 2007). *Gymnadenia conopsea* ssp. *conopsea* õisi tolmeldavad enamasti ööliblikad, kelle termoregulatsioon sõltub suuresti nektarist saadavast energiast (õine eluviis ei võimalda neil päikese käes soojeneda). Energia säästmise eesmärgil võivad tolmeldajad valida minimaalse lennutee ja küllastada mitut avatud õit ühes õisikus. See suurendaks geitonogaamiat ja lähinaabritevahelist õietolmuvahetust. Kuigi orhideede väikesed seemned võivad levida tuule abil väga kaugemale, langeb enamus seemneid emataime lähedale (Ackerman et al 1996). Selle tulemusel on noored taimed suure tõenäosusega lähedalt suguluses oma vahetute naabritega ning kui tolmeldajad küllastavad üksteisele lähedal asuvaid taimi, on tulemuseks populatsioonisisese struktureerumise ja inbriidingu teke (Campbell et al 2007).

2. Töö eesmärgid

Võttes arvesse eelpoolmainitud uuringute tulemusi, otsustasime uurida perekonna *Gymnadenia* Eesti populatsioonide morfoloogiliste ja geneetiliste tunnuste varieeruvust, selgitamaks välja taksonite omavahelised suhted.

Käesoleva töö eesmärkideks on:

1. Tuvastada taksonite *G. odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonidesisene ja taksonitesisene geneetiline varieeruvus ning geneetiline eristumine Eesti populatsioonides mikrosatelliitanalüüsi meetodil.
2. Hinnata Eesti populatsioonides taksonite *G. odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* morfoloogilist varieeruvust ning hinnata morfoloogilist eristumist.
3. Võrrelda morfoloogiliste tunnuste analüüsimisel leitud taksonite gruppe geneetiliste tunnuste põhjal identifitseeritud taksonite gruppidega.
4. Selgitada välja, kas *G. odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahelised morfoloogilised erinevused Eesti populatsioonides on piisavalt suured, et võimaldada nende eristamist looduses.
5. Saadud tulemuste põhjal täpsustada *G. conopsea* ssp. *densiflora* taksonoomiline staatus.

3. Materjal ja metoodika

3.1. Välitööde metoodika

2013. ja 2014. aastal koguti morfoloogiliste parameetrite andmed ja leheproovid mikrosateliitanalüüsiks kokku 222 perekonna *Gymnadenia* taimelt erinevatest Eesti populatsioonidest (Tabel 1-4). Iga taime liik või oletatav alamliik määrati välistunnuste põhjal. Juhul kui *G. conopsea* s.l. täpsem määramine morfoloogia põhjal alamliigiks *G. conopsea* ssp. *conopsea* või alamliigiks *G. conopsea* ssp. *densiflora* ei olnud võimalik, märgistati taim kui oletatav kahe alamliigi vaheline hübriid (G.x). Koguti andmed 60 *G. odoratissima* taime kohta ning 162 *G. conopsea* s.l. taime kohta, kellest omakorda 86 taime määrati alamliigiks *G. conopsea* ssp. *conopsea*, 52 taime alamliigiks *G. conopsea* ssp. *densiflora* ja 24 taime andmed, keda ei olnud haabituse põhjal võimalik kumbagi alamliiki paigutada, märgistati tähisega "G.x". Taimed valiti juhuslikkuse alusel, kuid jälgiti, et uuritud indiviidide omavaheline kaugus oleks minimaalselt 10 meetrit.

Morfoloogilistest parameetritest mõõdeti iga taime kõrgus, õisiku pikkus, loendati õite ja lehtede arv, mõõdeti kahe suurima lehe pikkus ja laius ning mõõdeti igal isendil viie erineva õie pikkus, laius, õie huule pikkus ja laius ning kannuse pikkus. Taime õite arvu ja õisiku pikkuse põhjal arvutati iga indiviidi õisiku tihedus. Kahe suurima lehe pikkuse ja laiuse põhjal leiti aritmeetilised keskmised, mis iseloomustavad iga taime keskmist lehe pikkust ja laiust. Mõõdetavad õied valiti õisikus eri kõrgustelt, kuid välditi tipmisi õisi, mis ei olnud veel täielikult avanenud. Viie õie parameetrite põhjal leiti aritmeetilised keskmised, mis iseloomustavad iga indiviidi õieparameetrite keskmisi väärtusi. Mõõdetud tunnused ja neile vastavad lühendid, mida kasutati andmeanalüüsil, on esitatud tabelis 5. Et võimaldada hilisemat määranu kontrollimist, tehti igast taimest fotod – taime õisikust ja kogu taimest. Mikrosateliituuringute tarvis võeti igalt taimelt umbes 2 cm² suurune leheproov, mis pakiti õhukese pabersalvräti tüki sisse, märgistati indiviidi koodiga ja hoiustati silikageelis kuni täieliku kuivamiseni.

Tabel 1 *Gymnadenia odoratissima* populatsioonide nimekiri, populatsioone iseloomustavad andmed ja uuritud isendite arv.

Populatsiooni kood	Leiukoht (küla, maakond)	Koordinaadid	Populatsiooni suurus (<i>G. odoratissima</i>)	Uuritud isendite arv
VO	Varangu, Lääne-Virumaa	59°2'15" N 26°6'30" E	40	15
LO	Lepiku, Tartumaa	58°15'40,5" N 26°42'38" E	25	15
NO	Nurme, Harjumaa	59°5'36" N 24°20'19" E	30	15
TO	Tagametsa, Harjumaa	59°11'32,5" N 24°30'0,6" E	25	15

Tabel 2 *Gymnadenia conopsea* ssp *conopsea* populatsioonide nimekiri, populatsioone iseloomustavad andmed ja uuritud isendite arv

Populatsiooni kood	Leiukoht (küla, maakond)	Koordinaadid	Populatsiooni suurus (<i>G. conopsea</i> s.l.)	Uuritud isendite arv
VC	Varangu, Lääne-Virumaa	59°2'15" N 26°6'30" E	150	11
NC	Nurme, Harjumaa	59°5'36" N 24°20'19" E	50	16
TC	Tagametsa, Harjumaa	59°11'32,5" N 24°30'0,6" E	50	18
PC	Pivarootsi, Läänemaa	58°32'38" N 23°36'29" E	150	4
EC	Esivere, Läänemaa	58°38'37,3" N 23°30'49" E	350	7
IC	Iide, Saaremaa	57°59'27,5" N 22°5'23,7" E	20	15
KC	Karala, Saaremaa	58°16'44,5" N 21°54'58" E	100	15

Tabel 3 *Gymnadenia conopsea* ssp *densiflora* populatsioonide nimekiri, populatsioone iseloomustavad andmed ja uuritud isendite arv.

Populatsiooni kood	Leiukoht (küla, maakond)	Koordinaadid	Populatsiooni suurus (<i>G. conopsea</i> s.l.)	Uuritud isendite arv
VD	Varangu, Lääne-Virumaa	59°2'15" N 26°6'30" E	150	11
ND	Nurme, Harjumaa	59°5'36" N 24°20'19" E	50	7
TD	Tagametsa, Harjumaa	59°11'32,5" N 24°30'0,6" E	50	10
PD	Pivarootsi, Läänemaa	58°32'38" N 23°36'29" E	150	5
ED	Esivere, Läänemaa	58°38'37,3" N 23°30'49" E	350	4
KD	Karala, Saaremaa	58°16'44,5" 21°54'58"	100	15

Tabel 4 *Gymnadenia* s.l. selge määranguta taimede (*G. x*) populatsioonide nimekiri, populatsioone iseloomustavad andmed ja uuritud isendite arv.

Populatsiooni kood	Leiukoht (küla, maakond)	Koordinaadid	Populatsiooni suurus (<i>G. conopsea</i> s.l.)	Uuritud isendite arv
VX	Varangu, Lääne-Virumaa	59°2'15" N 26°6'30" E	150	8
NX	Nurme, Harjumaa	59°5'36" N 24°20'19" E	50	4
TX	Tagametsa, Harjumaa	59°11'32,5" N 24°30'0,6" E	50	2
PX	Pivarootsi, Läänemaa	58°32'38" N 23°36'29" E	150	6
EX	Esivere, Läänemaa	58°38'37,3" N 23°30'49" E	350	4

Tabel 5 Mõõdetud tunnused ja neile vastavad lühendid, mida kasutati andmeanalüüsil.

Lühend	Tunnus	Ühik
TaK	Taime kõrgus	cm
ÕkP	Õisiku pikkus	cm
ÕiA	Õite arv	
ÕkT	Õisiku tihedus	õit/cm
LeA	Lehtede arv	
LeP	Lehe pikkus	cm
LeL	Lehe laius	cm
ÕiP	Õie pikkus	mm
ÕiL	Õie laius	mm
HuP	Huule pikkus	mm
HuL	Huule laius	mm
KaP	Kannuse pikkus	mm

3.2. DNA eraldamine

DNA eraldati silikageelis kuivatatud taimelehtedest „Soltis Lab CTAB DNA Extraction“ protokoll järgi. Protokoll on koostatud Doyle ja Doyle (1987) ning Cullings (1992) andmete põhjal ning see on mõeldud DNA eraldamiseks värsketest ja kuivatatud taimelehtedest. Eraldatud DNA kontrolliti geelelektroforeesil ning säilitati -18 °C juures.

3.3. Mikrosatelliitanalüüs

Mikrosatelliidid ehk mikrosatelliitsed järjestused (inglise keeles *microsatellites*, *microsatellite sequences*, *simple sequence repeats* – SSRs) on DNA järjestused, mis sisaldavad lühikesi, 1-6 nukleotiidi pikkusi, korduste arvult polümorfseid tandemkordusi (korduste arv jääb tavaliselt vahemikku 10-100). Varieeruvus ühe lookuse erinevate alleelide vahel seisnebki peamiselt erinevate korduste arvus. Et korduste arvu tuvastada, on vaja leida konkreetne mikrosatelliitmarker ja kasutada sellele vastavat praimerit PCR-i ehk polümeraasi ahelreaktsiooni (inglise keeles *polymerase chain reaction*) läbiviimisel. Mikrosatelliit-meetod on sobiv populatsioonigeneetikas geneetilise varieeruvuse ja isenditevahelise suguluse määramiseks, hübriidiseerumise uurimiseks ja geenide kaardistamiseks (Goldstein & Schlötterer 1999).

Mikrosatelliit-meetodi puuduseks on asjaolu, et ühe liigi jaoks väljatöötatud praimerid töötavad vaid selle sama liigi ja talle geneetiliselt lähedaste liikide puhul – mida suurem on liikidevaheline geneetiline kaugus, seda madalam on järjestuste amplifitseerumise efektiivsus (Jarne & Lagoda 1996).

Antud töös on kasutatud Campbell jt (2002) ja Gustafsson & Thorén (2001) poolt välja töötatud mikrosatelliitide praimereid.

3.3.1. Praimerite optimeerimine ja PCR

Et leida parimad tingimused iga praimeri amplifitseerumiseks uuritava DNA-l, on vajalik kasutatavate praimerite optimeerimine. See toimub praimerite seondumistemperatuuri või PCR-i reaktsioonisegu koostise või koostisosade koguste muutmise teel kuni sobivaima kombinatsiooni leidmiseni. Optimeerimiseks valiti 10 tuuma mikrosatelliidi praimerit (Tabel 6), mis on välja töötatud liigi *Gymnadenia conopsea* jaoks.

Praimerite optimeerimisel kasutati PCR-i gradientprogrammi ning katsetati seejuures 12 erineva seondumistemperatuuriga vahemikus +48,1...+64°C. Iga praimeri puhul tuvastati sellele sobivaim magneesiumiallikas. Praimeripaarist ühele lisati sellele sobiv märgis (kas CAGT või M13R), mis seondub PCR-i käigus fluorestseeruva märgisega (Tabel 6 ja tabel 7). Kasutati nelja erinevat fluorestseeruvat märgist: PET (punane), NED (kollane), VIC (roheline), FAM (sinine). Igale lookusele valiti värv selliselt, et sarnase pikkusega alleele sisaldavad lookused saaksid erineva värvi – sel juhul on võimalik tuvastada õigele lookusele vastavad alleelid ka PCR-i produktide kokkusegamisel.

Kümnest mikrosatelliit-lookusest neljaga õnnestus saada selgelt tõlgendatavaid tulemusi ning neid kasutati edasistes analüüsides. Lookus Gcon μ 1 märgistati fluorestseeruva märgisega FAM, lookus Gc29 märgisega NED, lookus Gc42 märgisega PET ja lookus Gc 77 märgisega VIC.

PCR viidi läbi 10 μ l reaktsioonisegus, kus märklaud-DNA-na kasutati kümnekordset lahjendust eraldatud DNA-st. Reaktsioonis kasutati märgistatud praimeri 0,5 μ M lahjendust ning märgiseta praimeri 5 μ M lahjendust.

Tabel 6 Optimeerimiseks valitud praimerid, nende nukleotiidsed järjestused, järjestuste koodid geenipangas ning praimerite 5'-märgised, kordusmotiivid ja pikkused (Campbell jt 2002, Gustafsson & Thorén 2001). F (forward) – pärisuunaline, R (reverse) – vastassuunaline.

Primeri (lookuse) tähistus	Primeri nukleotiidne järjestus (5'→3')	Järjestuse			
		kood geenipangas (GenBank)	5'- märgis	Kordus- motiiv	Pikkus (bp)
	F-ATGGTAATGCTCCTCCTCCTC				
Gconμ1	R-GAAGAAACTCGAGCAGGTGAG F-ACCCCAAAGCATGGAATCTAGC	AF324046	CAGT	(CA) ₁₇	149-193
Gconμ2	R-GCACATGACGCATTGCAATTAGAG F-ACAGACATAGACGCACAC	AF324047	M13R	(CA) ₁₇	131-161
Gconμ3	R-GCCCCTGTTCATTTGTAA F-CATCTCCAACACCATGAACATCAC	AF324048	M13R	(CA) ₁₃	184-242
Gconμ4	R-CCTTCATTAAGTGGCTACAAGTAACC F-GCCATAAATGCTCAGAAATGC	AF324049	CAGT	(CA) ₁₈	240-292
Gc17	R-GAGCTCATGCCCTTCTCC F-CATCTACACAATCATCCTAAGAAG	AF319985	M13R	(CT) _n *	199
Gc29	R-CTAGACGCCATGACTTACATG F-GAGTGAAGTGTCTTTAATCGATAAC	AF319986	M13R	(CT) ₁₀	183
Gc42	R-GGGAGAAAGAGTGTGCATGT F-TCTTTAACAGTTAACAATCTTATCTC	AF319988	CAGT	(CT) ₁₆	81
Gc49	R-CATTTAGAAGCAGGAGCAG F-GATCCTAGCTTTCGTTTCAT	AF319987	CAGT	(CT) ₂₀	171
Gc51	R-AGTAATCGAGGCAACCTG F-TCTTACAACATTTAGGACTC	AF319989	CAGT	(CT) ₁₇	147
Gc77	R-GCACAAGAATCTGTCATTA	AF319990	CAGT	(CT) ₁₆	132

Tabel 7 Praimerite märgised.

Märgise nimi	Nukleotiidne järjestus
M13R	AGGAAACAGCTATGACCAT
CAGT	ACAGTCGGGCGTCATCA

PCR reaktsioonisegu koostis:

0,6 µl GoTaqFlexi puhvrit (10x),

1,2 µl MgSO₄ või 1,6 µl MgCl₂,

0,6 µl dNTP lahust (2,5 mM igat nukleotiidi, kokku 10 mM),

0,5 µl pärisuunalist praimerit,

0,5 µl vastassuunalist praimerit,

0,5 µl fluorestseeruvat märgist (PET, VIC, NED või FAM),

0,05 µl BSA (veise seerumi albumiin, 100x),

0,05 µl Taq polümeraasi,

5 µl destilleeritud vett MgSO₄ puhul või 4,6 µl destilleeritud vett MgCl₂ puhul (nii et reaktsioonisegu lõppmaht oleks 10 µl),

1 µl märklaud-DNA-d.

Proovid amplifitseeriti termotsükleris järgmise programmi järgi:

1. Algne denaturatsioon 95 °C 5 minutit

2. Denaturatsioon 95 °C 1 minut

3. Praimerite seondumine optimeeritud temperatuuril 1 minut

4. Ahelate pikendamine 72 °C 1 minut

5. 2.-4. etapi kordamine 35 korda (35 tsükli)

6. Lõplik DNA ahelate pikendamine 72 °C 30 minutit

Saadud PCR-i produktid kontrolliti geelelektroforeesil ning säilitati -18 °C juures kuni fragmentanalüüsi läbiviimiseni.

3.3.2 Mikrosatelliitide fragmentanalüüs

Mikrosatelliitide fragmentanalüüsi läbiviimiseks lisati 500 µl Hi-Di formamiidile 10 µl suurusstandardit LIZ500 ning seda lahust kanti igasse mikrotiiterplaadi kaevu 10 µl. Seejärel lisati igasse kaevu 1,2 µl kümnekordselt lahjendatud PCR-produkti (või PCR-produktide segu). Mikrosatelliitide fragmentanalüüs viidi läbi Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis kapillaarsekvenaatoriga ABI 3730xl DNA Analyzer.

3.4. Andmeanalüüsi meetodid

3.4.1. Morfomeetriline analüüs

Morfoloogiliste andmete analüüsil on kirjeldavad statistikud (keskväärtus, standardhälve ja standardviga) arvutatud kasutades programmi Statistica 7. Sama programmiga on arvutatud tunnuste olulisus (liikide eristamisvõime) kasutades üldist lineaarmudeli analüüsi (GLM-general linear model analysis).

Programmis R Studio kasutati pakette MorphoTools (Koutecký 2014), vegan (Oksanen et al 2013), scatterplot3d (Ligges & Mächler 2003) ja ade4 (Dray & Dufour 2007). Kasutades eelnevaid pakette viidi läbi Pearsoni ja Spearmani korrelatsioonanalüüsid, morfoloogiliste tunnuste klasteranalüüs UPGMA (ehk kaalumata paaride) meetodil ning peakomponentanalüüs (PCA) nii populatsioonide kui indiviidide tunnuste põhjal.

3.4.2. Geneetiliste andmete analüüs

Fragmentanalüüsil saadud tulemusi analüüsiti programmiga Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems) vastavalt kasutatud suurusstandardile LIZ500 ning tuvastati amplifitseerunud DNA lõikude pikkused.

Microsoft Exceli põhise programmiga GenaA1Ex 6.501 (Peakall & Smouse 2012) arvutati geneetilisi andmeid iseloomustavad statistikud: keskmine alleelide arv, populatsioonide oodatud ja vaadeldud heterosügootsus ning inbriidingu koefitsient F ($F=1-(H_o/H_e)$). Võttes aluseks populatsioonide geneetilise distantsi teostati peakoordinaatanalüüs (PCoA). Uurimaks geneetilise varieeruvuse jaotumist populatsioonide ja indiviidide vahel viidi läbi hierarhiline AMOVA analüüs (Analysis of Molecular Variance). Kasutades Nei (Nei 1978) geneetilise identiteedi maatriksit (Pairwise Population Matrix of Nei Unbiased Genetic Identity) koostati programmidega Phylip 3.695 (Felsenstein 2013) ja FigTree 1.4.2 (Rambaut 2014) UPGMA meetodil dendrogramm.

Nii välitööd, DNA eraldamine, mikrosatelliitanalüüs kui ka andmete statistiline analüüs on läbi viidud töö autori poolt.

4. Tulemused

4.1. Morfoloogiline eristumine

Kirjeldavad statistikud (keskväärtus, standardhälve ja standardviga) taksonite lõikes on toodud tabelina töö lõpus (Lisa1). Üldist lineaarmudelit kasutades läbi viidud variatsioonanalüüs (GLM- one way ANOVA) nelja grupi vahel näitab, et kõik analüüsitud morfoloogilised tunnused eristavad taksoneid ($p < 0,001$) (Tabel 8, joonis 1). ANOVA analüüsiga arvatati F statistikud, mis näitavad, kas rühmade keskmiste erinevus on suurem, kui juhudispersiooniga seletada võib (Tabel 8).

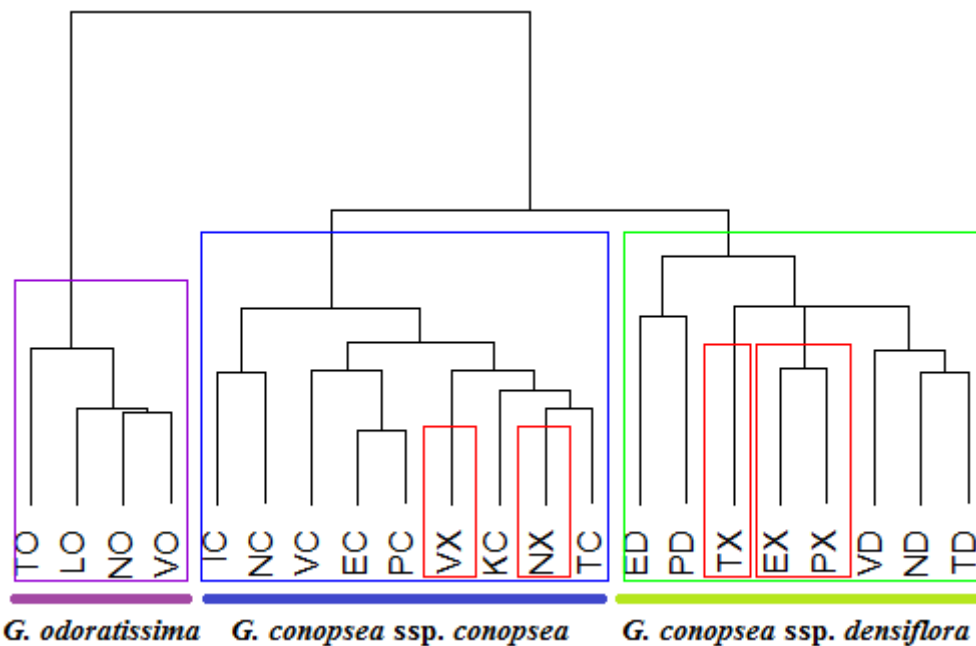
Tabel 8 Tunnused ning nende F ja p statistikute väärtused variatsioonanalüüsil kõikide taksonite vahel ning variatsioonanalüüsil *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahel. Sulgudes on antud vabadusastmed. Mida suurem on F statistiku väärtus, seda olulisem on mõju liikide eristamisele.

Tunnus	Kõikide taksonite vahel		<i>G. conopsea</i> ssp. <i>conopsea</i> ja <i>G. conopsea</i> ssp. <i>densiflora</i> vahel	
	F (3, 218)	P	F (1, 136)	p
Taime kõrgus (TaK)	66,51	$p < 0,001$	18,03	$p < 0,001$
Õisiku pikkus (ÕkP)	51,03	$p < 0,001$	14,32	$p < 0,001$
Õite arv (ÕiA)	55,39	$p < 0,001$	102,13	$p < 0,001$
Õisiku tihedus (ÕkT)	39,34	$p < 0,001$	79,24	$p < 0,001$
Lehtede arv (LeA)	37,35	$p < 0,001$	93,64	$p < 0,001$
Lehe pikkus (LeP)	48,47	$p < 0,001$	44,64	$p < 0,001$
Lehe laius (LeL)	140,79	$p < 0,001$	118,00	$p < 0,001$
Õie pikkus (ÕiP)	280,46	$p < 0,001$	7,60	$p < 0,01$
Õie laius (ÕiL)	137,72	$p < 0,001$	6,22	$p = 0,014$
Huule pikkus (HuP)	236,86	$p < 0,001$	2,74	n.s.
Huule laius (HuL)	272,43	$p < 0,001$	23,94	$p < 0,001$
Kannuse pikkus (KaP)	780,52	$p < 0,001$	2,45	n.s.

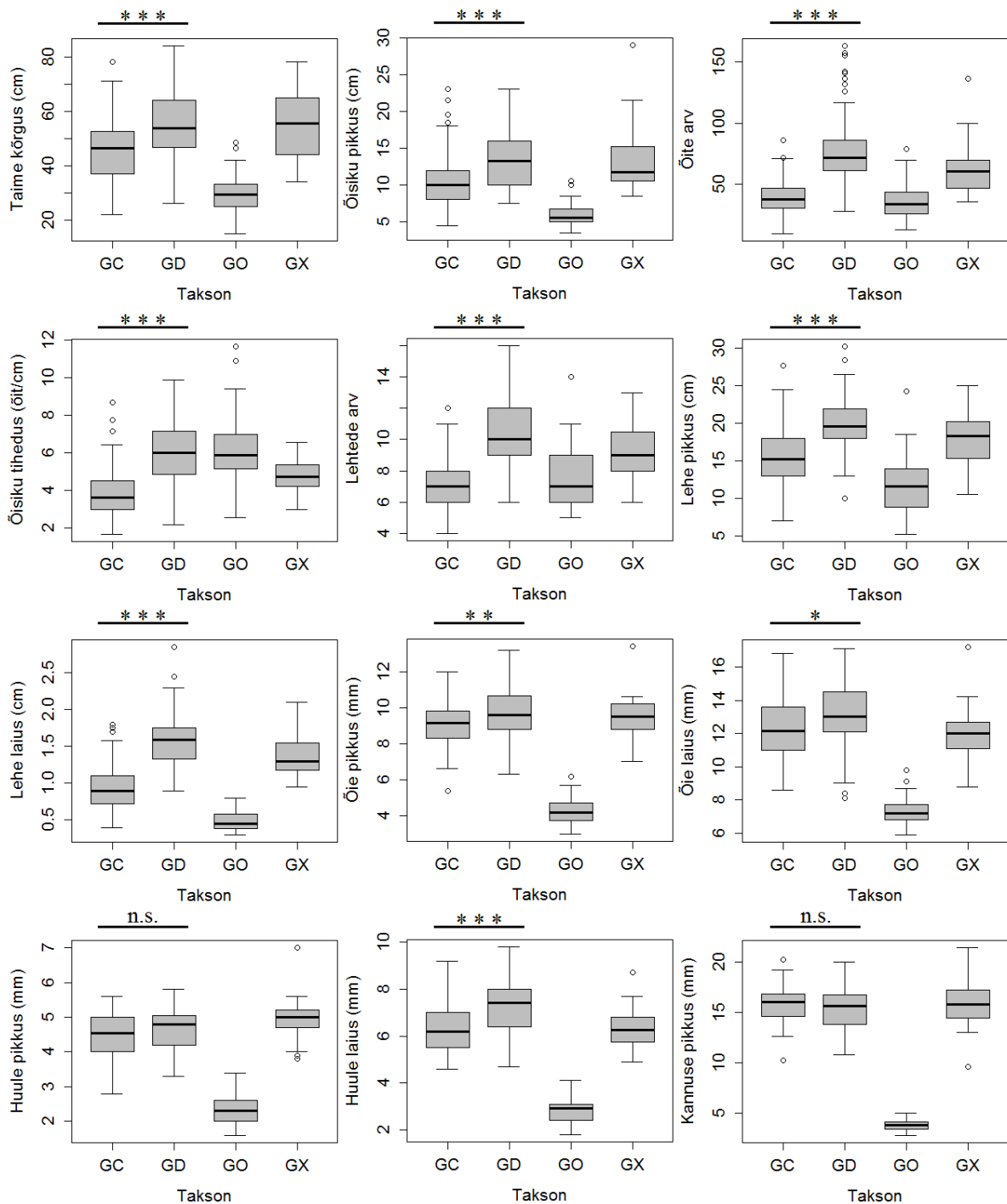
Gymnadenia conopsea ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahel läbi viidud variatsioonanalüüsil leiti kahe taksoni vahel statistiliselt olulised erinevused kümne tunnuse puhul kaheteistkümnest (Tabel 8, joonis 2). Võrreldes taksoniga *G. conopsea* ssp. *conopsea* esinesid *G. conopsea* ssp. *densiflora* puhul suuremad väärtused taime kõrguses ($p < 0,001$), õisiku pikkuses ($p < 0,001$), õite arvus ($p < 0,001$), õisiku tiheduses ($p < 0,001$), lehtede arvus ($p < 0,001$), lehe pikkuses ($p < 0,001$), lehe laiuses ($p < 0,001$), õie pikkuses ($p < 0,01$), õie laiuses ($p = 0,014$) ja huule laiuses ($p < 0,001$) (Tabel 8, joonis 2). Huule pikkuses ja kannuse pikkuses kahe taksoni vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

Morfoloogiliste tunnuste vaheliste seoste kirjeldamiseks läbiviidud Pearsoni ja Spearmani korrelatsioonanalüüsid näitasid, et ühegi tunnusepaari vahel ei esinenud kõrget korrelatsiooni (korrelatsioonikordaja $r < |0,95|$) ning kõiki tunnuseid kasutati edasistes analüüsides.

Morfoloogiliste tunnuste klasteranalüüs UPGMA (ehk kaalumata paaride) meetodil (Joonis 1) näitab, et *G. odoratissima* populatsioonid on klasterdunud selgelt eraldi klaadi. Kaks eraldi rühma moodustavad morfoloogiliste andmete põhjal ka *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonid. Populatsioonid, mille isendite selget taksonoomilist kuuluvust ei osatud morfoloogia põhjal määrata on jaotunud mõlema (*G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora*) klaadi vahel.



Joonis 1 UPGMA meetodil läbi viidud klasteranalüüsi dendrogramm. Populatsioonide tähistused tabelis 1-4.



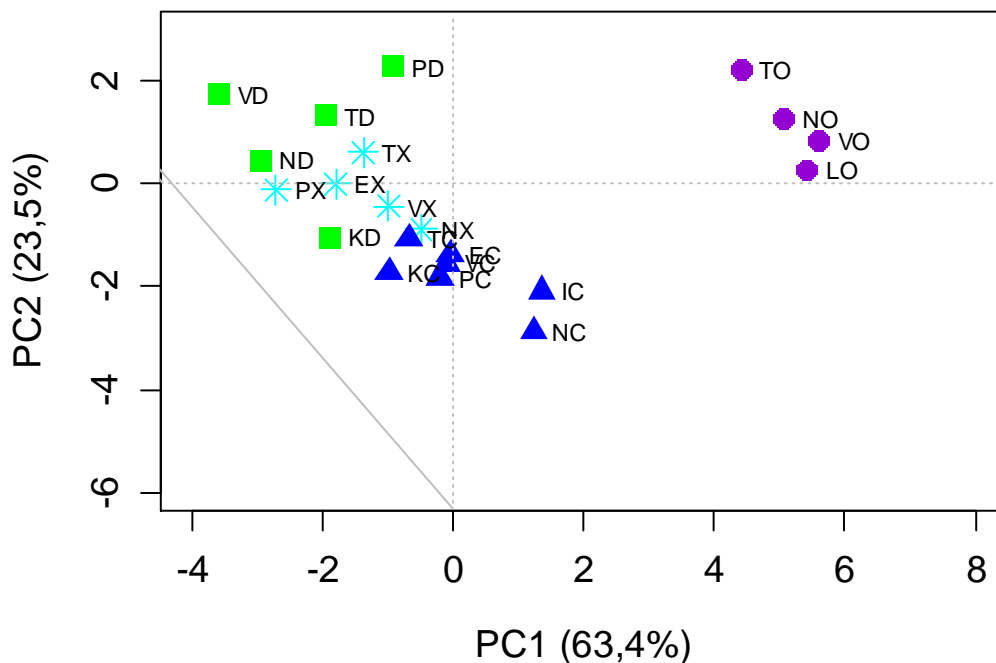
Joonis 2 Taksonite eristumine morfoloogiliste tunnuste põhjal (variatsioonanalüüsil kõigi tunnuste puhul $p < 0,001$). *Gymnadenia conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahel läbi viidud variatsioonanalüüsi statistiline olulisus on märgitud karpdiagrammide kohal: *** – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$; n.s. – statistiliselt mitteoluline.

Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

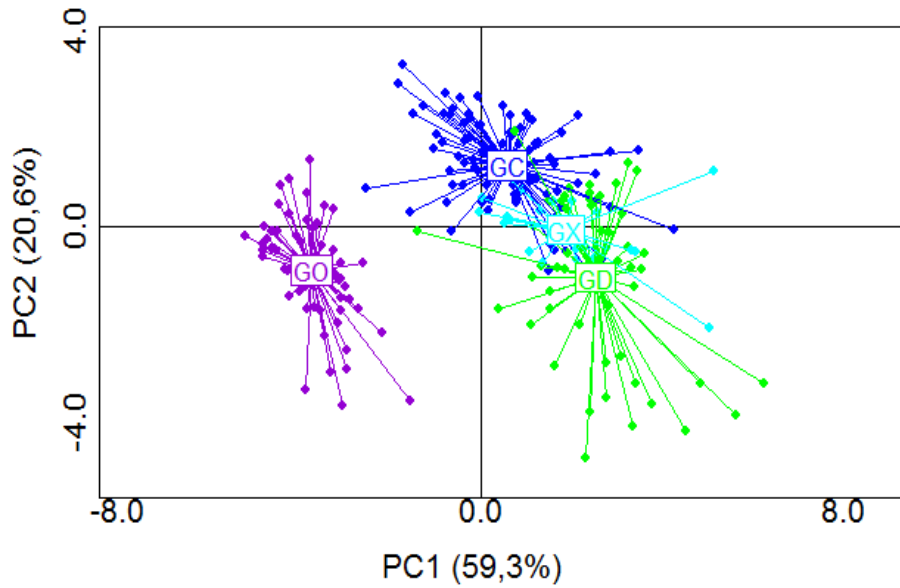
Populatsioonide peakomponentanalüüsi tulemusi on kujutatud kahemõõtmelisel teljestikul, kus peakomponent 1 ja 2 (PC1 ja PC2) kirjeldavad kokku 86,9% kogu populatsioonidevahelisest morfoloogilisest variatsioonist (Joonis 3).

Indiviidide peakomponentanalüüsi tulemusi on kujutatud kahemõõtmelisel teljestikul, kus peakomponent 1 ja 2 (PC1 ja PC2) kirjeldavad kokku 79,9% kogu indiviididevahelisest morfoloogilisest varieeruvusest (Joonis 4) ja kolmemõõtmelisel teljestikul, kus indiviididevahelisest morfoloogilisest varieeruvusest kirjeldatakse kolme peakomponendi poolt kokku 86,6% (Joonis 5).

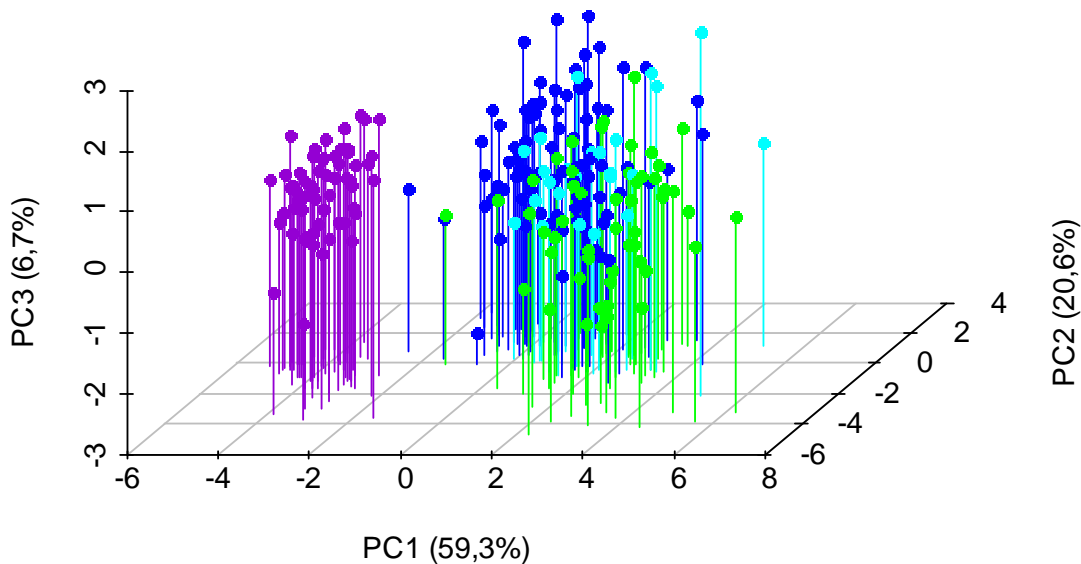
Nii populatsioonide kui indiviidide peakomponentanalüüsi tulemused näitavad, et *Gymnadenia odoratissima* on morfoloogiliste tunnuste põhjal selgelt eristunud teistest uuritud taksonitest. *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* moodustavad koos isenditega, kelle selget taksonoomilist kuuluvust ei osatud morfoloogia põhjal määrata, eraldi rühma, kusjuures *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* isendid grupeeruvad selgelt rühma eri servadesse ning selge määranguta isendid on vahepealse positsiooniga.



Joonis 3 Populatsioonide peakomponentanalüüs kahemõõtmelisel teljestikul. Populatsioonide tähistused tabelis 1-4.



Joonis 4 Indiviidide peakomponentanalüüs kahemõõtmelisel teljestikul. GC – *Gymnadenia conopsea* ssp. *conopsea*, GD – *G. conopsea* ssp. *conopsea*, GX – selge määranguta *G. conopsea* s.l. taimed, GO – *G. odoratissima*



Joonis 5 Indiviidide peakomponentanalüüs kolmemõõtmelisel teljestikul. Violetse värviga on tähistatud *G. odoratissima*, tumesinise värviga *G. conopsea* ssp. *conopsea*, roheline värviga *G. conopsea* ssp. *densiflora* ja helesinise värviga *G. conopsea* s.l. isendid, kelle selget taksonoomilist kuuluvust ei osatud morfoloogia põhjal määrata (G.x).

4.2. Geneetiline varieeruvus ja eristumine

Tabelis 9 on toodud nelja uuritud lookuse lõikes kõigi taksonite uuritud isendite arv, keskmine alleelide arv lookuses, vaadeldud ja oodatav heterosügootsus ning inbriidingukoefitsient. Keskmine alleelide arv lookuses näitab, et kõige suurem ($N_a=20,0$) on geneetiline varieeruvus taksonis *G. conopsea* ssp. *conopsea* ning kõige madalam ($N_a=6,5$) on *G. odoratissima* geneetiline varieeruvus. Kõikide taksonite puhul on vaadeldud heterosügootsus madalam kui oodatav heterosügootsus.

Fikseerumisindeks ehk inbriidingukoefitsient varieerub negatiivsetest väärtustest positiivseteni. Kõrged positiivsed väärtused viitavad inbriidingule, väärtused varieeruvad -1 (võõrtolmlev populatsioon) kuni +1 (isetolmlev populatsioon). Inbriidingukoefitsiendi väärtused on kõigil taksonitel positiivsed.

Tabelis 10 on toodud nelja lookuse lõikes kõigi populatsioonide uuritud isendite arv, keskmine alleelide arv lookuses, vaadeldud ja oodatav heterosügootsus ning inbriidingukoefitsient. Keskmine alleelide arv lookuses näitab, et kõige suurem ($N_a=12,25$) on geneetiline varieeruvus Karala *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonis (KD). Kõigis Esivere ja Pivarootsi populatsioonides, Tagametsa ja Nurme *G. conopsea* ssp. *densiflora* ja G.x populatsioonides ning Nurme *G. odoratissima* populatsioonides on vaadeldud heterosügootsus kõrgem oodatud heterosügootsusest. Teistes populatsioonides on vaadeldud heterosügootsus oodatud heterosügootsusest madalam. Suurim vahe oodatud ja vaadeldud heterosügootsuse vahel on Varangu *G. conopsea* ssp. *conopsea* populatsioonis ($H_e-H_o=0,159$). See näitab, et esineb vähem heterosügoote kui oodatud vastavate alleelide sageduste juures ning antud populatsiooni puhul ei kehti Hardy-Weinbergi tasakaal.

Inbriidingukoefitsiendi väärtused on kõige madalamad Tagametsa G.x populatsioonis ($F=-0,556$) ja Pivarootsi *G. conopsea* ssp. *conopsea* populatsioonis ($F=-0,517$). Kõige kõrgemad inbriidingukoefitsiendi väärtused on Varangu ja Lepiku *G. odoratissima* populatsioonides ($F=0,251$ ja $F=0,228$) viidates isetolmlemisele.

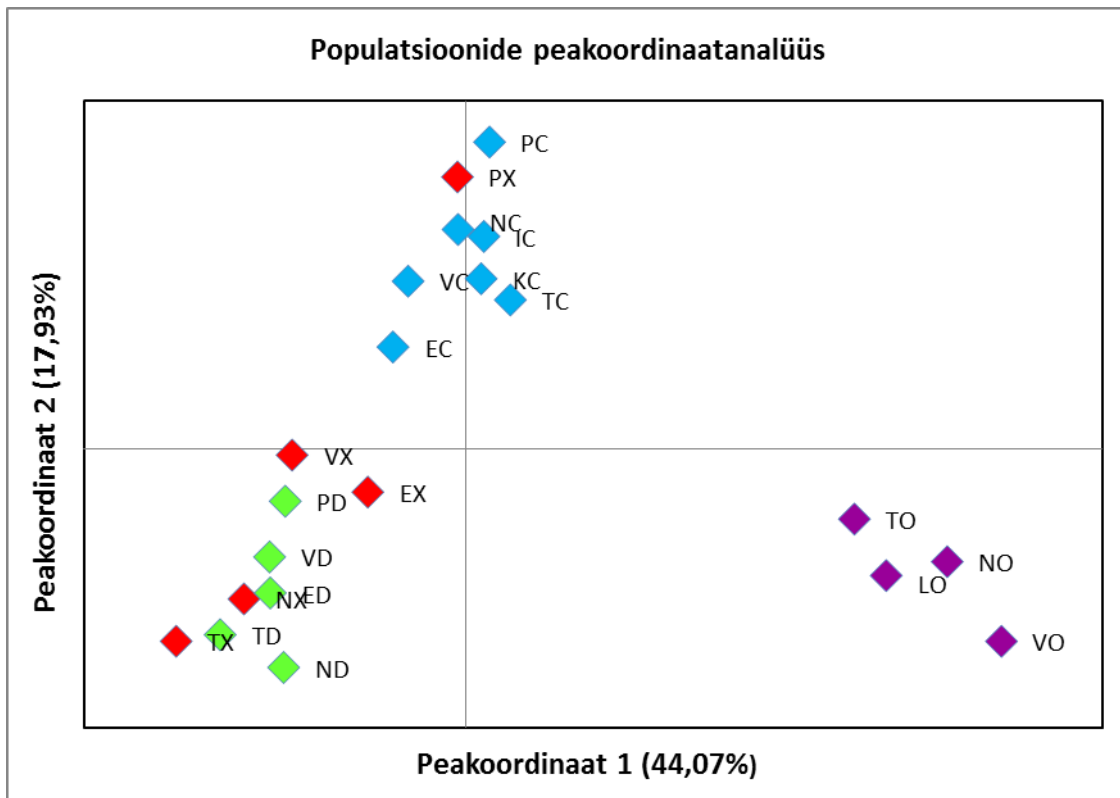
Tabel 9 Taksonite keskmine uuritud isendite arv nelja lookuse lõikes (N) keskmine alleelide arv lookuses (Na), vaadeldud heterosügootsus (Ho), oodatav heterosügootsus (He) ning inbriidingukoefitsient (F) nelja lookuse lõikes.

Takson	N	Na	Ho	He	F
<i>G. conopsea ssp. conopsea</i>	85,5	20,0	0,711	0,877	0,189
<i>G. conopsea ssp. densiflora</i>	51,5	16,75	0,713	0,830	0,136
<i>G. odoratissima</i>	44,5	6,5	0,361	0,503	0,307
G. x	24,0	11,0	0,688	0,769	0,098

Tabel 10 Populatsioonide keskmine uuritud isendite arv nelja lookuse lõikes (N), keskmine alleelide arv lookuses (Na), vaadeldud heterosügootsus (Ho), oodatav heterosügootsus (He) ning inbriidingukoefitsient (F) nelja lookuse lõikes. Populatsioonide tähistused tabelis 1-4.

Pop	N	Na	Ho	He	F
EC	7	6,25	0,821	0,707	-0,167
ED	4	2,5	0,688	0,469	-0,439
EX	4	5	0,813	0,766	-0,06
IC	15	8,5	0,717	0,784	0,084
KC	15	9,75	0,733	0,827	0,104
KD	14,75	12,25	0,814	0,846	0,045
LO	11,25	3,75	0,4	0,499	0,228
NC	16	11,25	0,672	0,792	0,147
ND	7	3,25	0,643	0,594	-0,046
NO	10,75	2,75	0,432	0,373	-0,103
NX	4	3,25	0,688	0,586	-0,242
PC	4	3	0,875	0,586	-0,517
PD	5	4,5	0,75	0,675	-0,116
PX	6	5	0,75	0,653	-0,146
TC	17,5	7,5	0,672	0,725	0,036
TD	9,75	4,75	0,661	0,631	-0,102
TO	11,25	3	0,333	0,411	0,159
TX	2	2,25	0,625	0,406	-0,556
VC	11	9,25	0,659	0,818	0,2
VD	11	6,5	0,659	0,708	0,067
VO	11,25	3	0,283	0,31	0,251
VX	8	5	0,594	0,627	0,075

Võttes aluseks populatsioonide geneetilised distantid teostati peakoordinaatanalüüs (PCoA) (Joonis 6). Populatsioonide peakoordinaatanalüüsi tulemusi on kujutatud kahemõõtmelisel teljestikul, kus peakoordinaadid 1 ja 2 kirjeldavad kokku 62% kogu populatsioonidevahelisest geneetilisest variatsioonist. Tulemused näitavad, et *G. odoratissima* on mikrosatelliitandmete peakoordinaatanalüüsi põhjal teistest uuritud populatsioonidest tugevalt eristunud. Samuti grupeeruvad *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonid selgelt erinevatesse rühmadesse. Populatsioonid, milles isendite selget taksonoomilist kuuluvust ei osatud morfoloogia põhjal määrata, ühtset rühma ei moodusta. Neist üks, Pivarootsi populatsioon, on rühmitunud ühte gruppi *G. conopsea* ssp. *conopsea* populatsioonidega ning ülejäänud *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonidega.

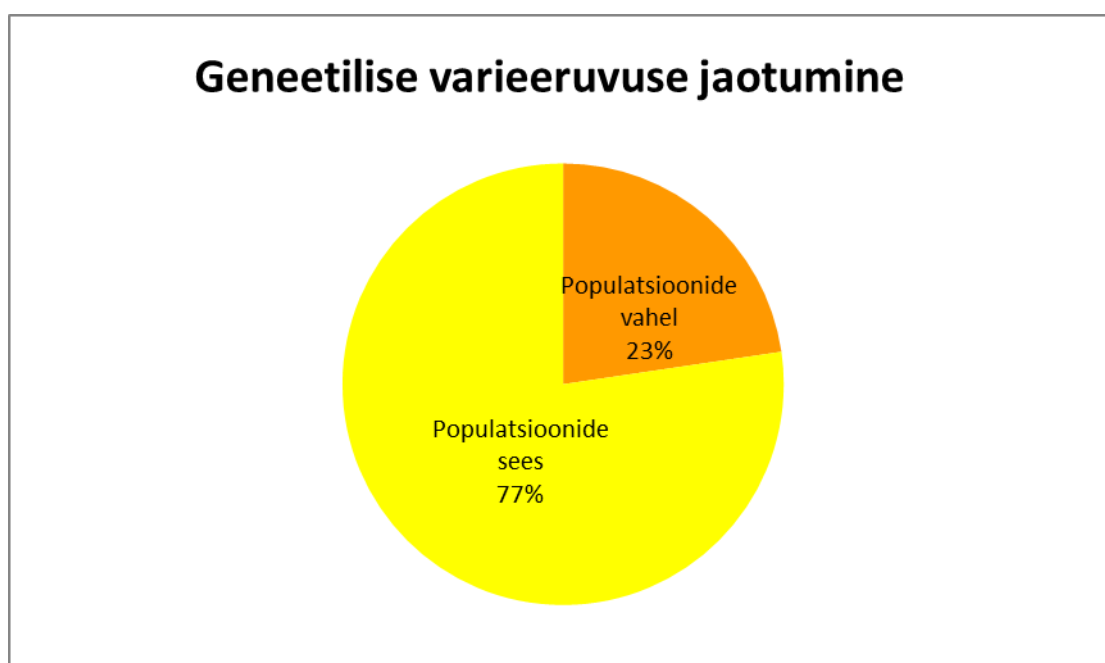


Joonis 6 Populatsioonide peakoordinaatanalüüs geneetiliste distantide põhjal. Populatsioonide tähistused tabelis 1-4.

Et uurida geneetilise varieeruvuse jaotumist populatsioonide ja indiviidide vahel viidi läbi hierarhiline AMOVA analüüs. Tulemuseks saadi molekulaarse varieerumise jaotumine tasemeti: populatsioonide vaheline 23% ja populatsioonide sisene 77% (joonis 7). Kõikide tasemete mõju on statistiliselt oluline ($p < 0,001$) (Tabel 11).

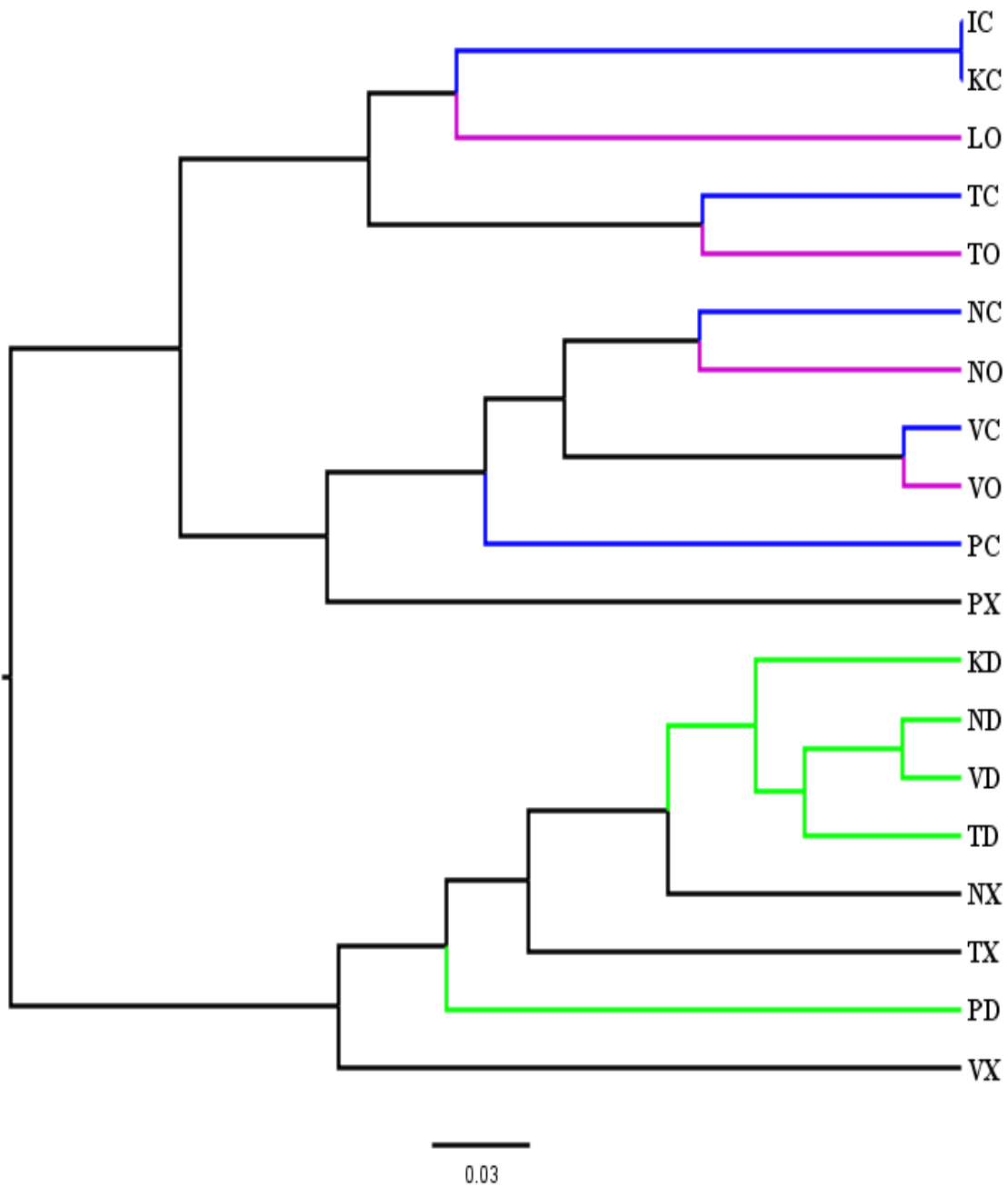
Tabel 11 Hierarhiline AMOVA analüüs, df – vabadusastmete arv, SS – ruutude summa, MS – SS/df, % - varieeruvuse määr, p – statistiline olulisus.

Varieeruvuse tase	df	SS	MS	%	p
Populatsioonide vahel	20	189,85	9,492	23%	p<0,001
Populatsioonide sees	415	561,75	1,354	77%	p<0,001
Kokku	435	751,60		100%	



Joonis 7 Geneetilise varieeruvuse jaotumine hierarhiline AMOVA analüüs põhjal.

Nei geneetilise identiteedi maatriksi põhjal loodi UPGMA meetodil dendrogramm (Joonis 8), millelt näeb, et kõik uuritud populatsioonid on jaotunud kahte klastrisse. *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonid on klasterdunud koos kolme G.x populatsiooniga selgelt eristuvasse rühma. Taksoneid *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. odoratissima* UPGMA dendrogramm omavahel ei erista. *Gymnadenia conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. odoratissima* populatsioonidega ühte klaadi rühmitub ka Pivarootsi populatsioon PX, mille isendite selget taksonoomilist kuuluvust ei osatud morfoloogia põhjal määrata.



Joonis 8 UPGMA meetodil loodud dendrogramm Nei geneetilise identiteedi maatriksi põhjal. Violetse värviga on märgitud *G. odoratissima*, sinise värviga *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja roheline värviga *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonid.

5. Arutelu

5.1. Taksonite morfoloogiline eristumine

Taksonitest *G. odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* omab teistest selgelt eristavaid määramistunnuseid vaid liik *G. odoratissima*. Taksoneid *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* omavahel eristavate määramistunnuste väljaselgitamiseks varem läbi viidud uurimistööd ei ole tuvastanud ühtki morfoloogilist tunnust, mis võimaldaks läbinisti selget taksonite eraldamist (Marhold et al 2005, Soliva & Widmer 1999, Stark et al 2011). Näidatud on küll mitmete tunnuste statistiliselt olulist erinevust kahe taksoni vahel, kuid sellest hoolimata võib looduslikes populatsioonides esineda märkimisväärne varieeruvus, mis takistab ühest liigi määramist (Marhold et al 2005, Stark et al 2011).

Käesolevas töös läbi viidud morfomeetrilised analüüsid näitavad liigi *Gymnadenia odoratissima* selget eristumist teistest uuritud taksonitest välisehituslike tunnuste poolest. Samuti näidatakse mitmete morfoloogiliste tunnuste statistiliselt olulist erinevust taksonite *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahel. Tugevaim eristumine kahe taksoni vahel ($p < 0,001$) leiti õite arvus, õisiku tiheduses, lehtede arvus ja lehe laiuses sarnaselt Stark jt (2011) tööle ning lisaks ka taime kõrguses, õisiku pikkuses, lehe pikkuses ja huule laiuses. Õie pikkus, mis käesolevas töös taksoneid võrdlemisi hästi eristas ($p < 0,01$), Stark jt (2011) töös statistiliselt oluliseks ei osutunud. Kannuse pikkus ei olnud antud töös statistiliselt oluliseks määramistunnuseks taksonite *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahel, kuid Stark jt (2011) näitasid, et see tunnus eristab kaht uuritud taksonit ($p < 0,01$). Eelmainitud töös uuriti morfoloogilisi tunnuseid *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* Saksamaa populatsioonides ning seetõttu võib taksonisene morfoloogiline varieeruvus sõltuda uuritud regioonist.

Nii klasteranalüüs kui ka peakomponentanalüüs näitavad, et käesolevas töös analüüsitud taksonid eristuvad morfoloogiliste tunnuste poolest eraldi rühmadesse. 2005. aastal viisid Marhold jt läbi samad analüüsid Tšehhi ja Slovakkia *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* taimede morfoloogiliste tunnustega ning näitasid samuti populatsioonide selget rühmitumist taksonite kaupa. Küll aga märgivad Soliva ja Widmer (1999) Šveitsi populatsioonide ning Stark jt (2011) Saksamaa populatsioonide andmeid kasutades, et diskriminantanalüüsil ei tuvastatud taksonitevahelist erinevust ei reproduktiivsete ega ka vegetatiivsete tunnuste puhul.

Käesolev töö kinnitab, et taksonite *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahel esineb statistiliselt oluline erinevus mitmete morfoloogiliste tunnuste väärtustes (Tabel 8, joonis 1). Kuna aga morfoloogiliste andmete kogumisel eristati eraldi grupina isendid, kelle taksonoomilist kuuluvust ei olnud üldise haabituse põhjal võimalik selgelt määrata (niioelda vahepealsed isendid, kes siin uuringus märgistati kui hübriidsed isendid), ei ole võimalik määrata selgeid tunnuste väärtuste vahemikke, mis oleks iseloomulikud konkreetsele taksonile. Hübriidsetel isenditel võivad olla kahe vanemaga võrreldes vahepealsed tunnused. Tagasiristumise puhul toimub morfoloogiline ühtlustumine ühe või teise vanemliikiga ning seetõttu sõltub igas konkreetses uurimuses leitud tulemus sellest, kui palju leidub uuritud populatsioonides hübriide ja kas on toimunud introgressioon ehk tagasiristumine.

Kooskõlas varem läbi viidud uurimistöödega (Marhold et al 2005, Stark et al 2011) näitab käesolev töö, et parimateks taksoneid *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* eristavateks välisehituslikeks tunnusteks on taime kõrgus, õite arv, õisiku tihedus, lehtede arv ja lehte laius. Looduslikes populatsioonides võivad morfoloogiliste tunnuste varieeruvust mõjutada väga erinevad tegurid, näiteks kasvukoha iseärasused, interaktsioonid erinevate seenpartneritega ning tolmeldajate valik, mistõttu taksoni selge määramine välisehituslike tunnuste põhjal ei pruugi olla võimalik (Gupta et al 2014, Stark et al 2011).

5.2. Taksonite geneetiline varieeruvus ja eristumine

Käesoleva magistritöö mikrosatelliit-analüüsi tulemused näitavad, et geneetilise mitmekesisuse parameetrite väärtused erinevad märkimisväärselt uuritud populatsioonides. Suurim geneetiline varieeruvus esineb Karala *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonis, kus keskmine alleelide arv lookuses oli 12,25 (Tabel 9). Väiksem keskmine alleelide arv lookuses ($N_a=2,25$) leiti TX populatsioonis. Samuti erineb populatsiooniti vaadeldud ($H_o=0,283-0,875$) ja oodatava heterosügootsuse ($H_e=0,310-0,846$) väärtused.

Vaid liigi *G. odoratissima* ühe populatsiooni inbriidingukoefitsient omab negatiivset väärtust (Tabel 9). Teiste *G. odoratissima* populatsioonide inbriidingukoefitsiendid on positiivsed, viidates toimunud iseviljastumisele, geitonogaamiale või lähisugulastevahelisele ristumisele. Selline tulemus võib olla põhjustatud asjaolust, et haruldase *G. odoratissima* populatsioonid on väikesed ja üksteisest geograafiliselt eraldunud. Kõrgeid inbriidingu näitajaid *G. odoratissima* populatsioonides on täheldanud ka Gustafsson ja Sjögren-Gulve (2002) ning Campbell jt (2007).

Käesolevas töös läbi viidud peakoordinaatanalüüs geneetiliste distantside põhjal näitab, et liik *G. odoratissima* eristub selgelt teistest töös vaadeldud taksonitest (Joonis 7). Ka *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* populatsioonid jagunevad selgelt erinevatesse rühmadesse, kirjeldades antud taksonite geneetilist lahknemist. Nei geneetilise identiteedi maatriksi põhjal loodud UPGMA dendrogramm kinnitab samuti *G. conopsea* ssp. *densiflora* paigutumist eraldi rühma, kuid ei eralda omavahel taksonid *G. odoratissima* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea*. *Gymnadenia conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahelist geneetilist varieeruvust on uuritud ITS-regiooni põhjal Kesk-Euroopa populatsioonides (Stark et al 2011) ning mikrosatelliit-järjestuste põhjal Briti saartel (Campbell et al 2007). Mõlemas uurimuses eristusid *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* kahe eraldiseisva rühmana, andes kinnitust käesolevas töös leitule.

5.3. Taksonoomiline käsitlus

Antud töös leitud morfomeetriliste analüüside tulemused on kooskõlas töös leitud geneetiliste analüüside tulemustega. Liik *Gymnadenia odoratissima* on nii morfoloogiliselt kui geneetiliselt selgelt erinev teistest Eestis esinevatest perekonna *Gymnadenia* taksonitest. Käesolev töö näitab taksonite *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* selget geneetilist lahknemist, mida toetavad ka morfomeetriliste analüüside käigus välja selgitatud statistiliselt olulised erinevused mitmetes välisehituslikes tunnustes. Võttes arvesse saadud tulemusi ning asjaolu, et *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahelist geneetilist eristumist on kirjeldatud ka varasemates uurimistöodes nii cpDNA, ITS-regiooni, mikrosatelliit-markerite kui ka teiste näitajate uurimisega ning tuvastatud kahe taksoni märkimisväärne erinevus (Campbell et al 2007, Gustafsson 2000, Marhold et al 2005, Soliva & Widmer 1999, Stark et al 2011, Trávníček et al 2012), tuleks antud taksonid käsitleda kahe erineva liigina. Seega leiduks Eestis perekonnas *Gymnadenia* kolm iseseisvat liiki: *G. conopsea*, *G. densiflora* ning *G. odoratissima*.

5.4. Ohustatus ja kaitse

Perekonna *Gymnadenia* liigid on ühed paljudest taimeliikidest, keda mõjutavad negatiivselt uued põllumajandusvõtted, metsamajandus ja soode kuivendamine (Gustafsson 2000). Suureks ohuks (eriti *G. odoratissima* jaoks) on kasvukohtade fragmenteerumine ja väikeste, üksikute kaugel asuvate populatsioonide tekkimine, mis võib viia geenivoolu vähenemise ja

alleelide kadumiseni (Gustafsson 2000). Väikeste populatsioonide ohuks on ka geenitriiv ja inbriiding, mis soodustavad samuti geneetilist erosiooni (Gustafsson 2000). Vähenenud geneetiline varieeruvus omakorda võib aga limiteerida taimede võimet reageerida hilisematele keskkonnamuutustele.

Nagu paljude teiste ohustatud liikide puhul, on ka *Gymnadenia* liikide säilimiseks vajalik just nende kasvukohtade kaitse (Gustafsson 2000). Kuna taksonit *G. conopsea* ssp. *densiflora* käsitletakse hetkel *G. conopsea* s.l. alamliigina, ei ole esimese levikuandmed kuigi täielikud. Kui *G. conopsea* ssp. *densiflora* tunnistada eraldi liigiliseks taksoniks võib muutuda ka liikide kaitsekäsitlus, mistõttu tuleks selgitada välja *G. conopsea* ssp. *densiflora* levik, hinnata tema esinemissagedust ja vajadusel teha muudatusi kaitsekorralduses (Campbell et al 2007).

Iga geneetiliselt erinevat populatsioonide gruppi tuleks käsitleda evolutsiooniliselt olulise üksusena, vaatamata selle morfoloogilisele sarnasusele mõne teise grupiga või võimele anda järglasi mõne teise grupiga (Soltis & Gitzendanner, 1999). Igal liigil on eriomased alleelid, mille kaotamine liigi väljasuremisel vaesustaks oluliselt terve perekonna geneetilist varieeruvust (Campbell et al 2007).

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli tuvastada Eesti populatsioonides perekonda *Gymnadenia* kuuluvate liikide ja alamliikide (*G. odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora*) populatsioonidesisene ja taksonitesisene geneetiline varieeruvus ning geneetiline eristumine mikrosatelliitanalüüsi meetodil. Hinnata uuritud taksonite morfoloogilist varieeruvust ning morfoloogilist eristumist ning selgitada välja, kas taksonite vahelised morfoloogilised erinevused Eesti populatsioonides on piisavalt suured, et võimaldada nende eristamist looduses. Võrrelda morfoloogiliste tunnuste analüüsimisel leitud taksonite gruppe geneetiliste tunnuste põhjal identifitseeritud taksonite gruppidega ning saadud tulemuste põhjal täpsustada *G. conopsea* ssp. *densiflora* taksonoomiline staatus.

Morfoloogiliste tunnuste varieerumise määramiseks mõõdeti uuritavatesse taksonitesse kuuluvate taimede kõrgus, õisiku pikkus, loendati õite ja lehtede arv, mõõdeti kahe suurima lehe pikkus ja laius ning mõõdeti igal isendil viie erineva õie pikkus ja laius, õie huule pikkus ja laius ning kannuse pikkus. Tunnuste põhjal teostati erinevad morfomeetrilised analüüsid. Leiti, et käesolevas töös analüüsitud taksonid eristuvad morfoloogiliste tunnuste poolest eraldi rühmadesse. Lisaks leiti, et statistiliselt olulisemateks taksonideid *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* eristavateks välisehituslikeks tunnusteks on taime kõrgus, õite arv, õisiku tihedus, lehtede arv ja lehtede laius, kuid tõdeti, et taksonite selge määramine looduses välistunnuste põhjal ei pruugi alati olla võimalik.

Geneetilise varieeruvuse tuvastamiseks analüüsiti nelja tuuma mikrosatelliitlookust ning leiti selged geneetilised erinevused *Gymnadenia odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* ja *G. conopsea* ssp. *densiflora* vahel. Võttes arvesse eelnevates uurimistöodes leitud ja käesoleva töö tulemusi, tehti ettepanek käsitleda alamliiki *G. conopsea* ssp. *densiflora* eraldi liigilise taksonina.

Summary

Morphological and genetic variation in Estonian populations of the orchid genus *Gymnadenia*

The aim of this study was to identify genetic variation within populations and taxons; and to analyse genetic differentiation of species and subspecies of the genus *Gymnadenia* (*G. odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* and *G. conopsea* ssp. *densiflora*) in Estonian populations; using microsatellite analysis method. Also to assess the morphological variation and morphological differentiation of the studied taxa and to find out whether the morphological differences between taxa are high enough to allow their differentiation in natural populations. The study aimed to compare taxon groups found in the analysis of the morphological characteristics with taxon groups found in the analysis of the genetic characteristics. To specify the taxonomic status of *G. conopsea* ssp. *densiflora*.

To determine the variation of morphological characteristics 12 vegetative and floral traits were measured or counted on every studied plant. Different morphometric analyzes were performed based on these characteristics. It was found that analyzed taxa are distinguished by morphological characteristics. In addition, it was found that morphological characteristics that distinguish *G. conopsea* ssp. *conopsea* and *G. conopsea* ssp. *densiflora* in the fullest extent, include plant height, number of flowers, inflorescence density, number of leaves and leaf width, but it was noted that the clear determination of taxa in natural populations may not always be possible.

To identify the genetic variability four nuclear microsatellite loci were analyzed and clear genetic differences between *Gymnadenia odoratissima*, *G. conopsea* ssp. *conopsea* and *G. conopsea* ssp. *densiflora* were found. Taking into account the findings from previous papers and from this study the recognition of *G. conopsea* ssp. *densiflora* as a distinct species was supported.

Tänuõnad

Minu suurim tänu ja austus kuulub minu juhendajale Tatjana Ojale. Lisaks tänan Toomas Hirset, kes oli abiks taimepopulatsioonide leidmisel ja andmete kogumisel ning Margarita Mürki ja Lisanna Schmidt, kellelt sain õpetust laboritöö ja statistilise analüüsi kohta. Tänan Anne Kuusksalut ja Maret Kaljulaidu abi eest välitöödel ning Tartu Ülikooli Botaanikaia öövahti kannatliku meele eest.

Kasutatud kirjandus

- Ackerman, J. D., Sabat, A., Zimmerman, J. K. 1996. Seedling establishment in an epiphytic orchid: an experimental study of seed limitation. *Oecologia* 106: 192-198.
- Bateman, R. M., Hollingsworth, P. M., Preston, J., YI-BO, L. U. O., Pridgeon, A. M., Chase, M. W. 2003. Molecular phylogenetics and evolution of *Orchidinae* and selected *Habenariinae* (*Orchidaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 142: 1-40.
- Campbell, V. V., Rowe, G., Beebee, T. J., Hutchings, M. J. 2002. Isolation and characterization of microsatellite primers for the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Brown (*Orchidaceae*). *Conservation Genetics*, 3: 209-210.
- Campbell, V. V., Rowe, G., Beebee, T. J. C., Hutchings, M. J. 2007. Genetic differentiation amongst fragrant orchids (*Gymnadenia conopsea* s.l.) in the British Isles. *Botanical journal of the Linnean Society* 155: 349-360.
- Cullings, K. W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1: 233-240.
- Delforge, P. 2006. *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East*. 3. A&C Black Publishers Ltd., London.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dray, S., Dufour, A. B. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*. 22: 1-20.
- Eichwald K., Kukk E., Kuusk V., Lellep E., Mäemets A., Rebassoo H., Sander R., Talts S., Trei T., Viljasoo L. 1984. *Eesti NSV flora*. 9. Valgus, Tallinn.
- Felsenstein, J. 2013. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.695. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (toim.). 1999. *Microsatellites Evolution and applications.*: Oxford University Press, New York.
- Grant, V. 1994. Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 3-10.
- Gross, K., Schiestl, F. P. 2015. Are tetraploids more successful? Floral signals, reproductive success and floral isolation in mixed-ploidy populations of a terrestrial orchid. *Annals of botany*, 115: 263-273.

- Gustafsson, S. 2000. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology* 9: 1863-1872.
- Gustafsson, S., Lönn, M. 2003 Genetic differentiation and habitat preference of flowering-time variants within *Gymnadenia conopsea*. *Heredity* 91: 284-292.
- Gustafsson, S., Sjögren-Gulve, P. 2002. Genetic diversity in the rare orchid, *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea*. *Conservation Genetics* 3: 225-234.
- Gustafsson, S., Thorén, P. A. 2001. Microsatellite loci in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology Notes* 1, 81-82.
- Huber, F. K., Kaiser, R., Sauter, W., Schiestl, F. P. 2005. Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (*Orchidaceae*). *Oecologia* 142: 564-575.
- Jarne, P., Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Evolution and Ecology* 11: 424-429.
- Junker, R. R., Blüthgen, N. 2010. Floral scents repel facultative flower visitors, but attract obligate ones. *Annals of botany* 105: 777-782.
- Koutecký, P. 2014. MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. *Plant Systematics and Evolution*: 1-7.
- Kukk, T., Kull, T., 2005. Eesti taimede levikuatlas. Eesti Maaülikool, Tartu.
- Lee, S. S. 2002. A review of orchid mycorrhizae in Korea. *The Plant Pathology Journal* 18: 169-178.
- Ligges, U., Mächler, M. 2003. Scatterplot3d - an R Package for Visualizing Multivariate Data. *Journal of Statistical Software* 8: 1-20.
- Marhold, K., Jongepierová I., Krahulcová A., Kučera J. 2005. Morphological and karyological differentiation of *Gymnadenia densiflora* and *G. conopsea* in the Czech Republic and Slovakia. *Preslia* 77: 159-176.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Wagner, H. 2013. Package 'vegan'. *Community ecology package* 2.
- Peakall, R., Smouse, P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Pridgeon, A. M., Bateman, R. M., Cox, A. V., Hapeman, J. R., Chase, M. W. 1997. Phylogenetics of subtribe *Orchidinae* (*Orchidoideae*, *Orchidaceae*) based on nuclear

- ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana* 12: 89-109.
- Rambaut, A. 2014. FigTree 1.4.2 software. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Reinhard, H. R., Götz, P., Peter, R., Wildermuth, H. 1991. Die Orchideen der Schweiz und Angrenzender Gebiete. Fotorotar AG, Šveits.
- Schiestl, F. P., Schlüter, P. M. 2009 Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids. *Annual review of entomology* 54: 425-446.
- Soliva, M., Widmer, A. 1999. Genetic and floral divergence among sympatric populations of *Gymnadenia conopsea* s.l. (*Orchideaceae*) with different flowering phenology. *International Journal of Plant Sciences* 160: 897-905.
- Stark, C., Michalski, S. G., Babik, W., Winterfeld, G., Durka, W. 2011. Strong genetic differentiation between *Gymnadenia conopsea* and *G. densiflora* despite morphological similarity. *Plant Systematics and Evolution* 293: 213-226.
- Stpiczyńska, M. 2001. Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L. (*Orchidaceae*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 70: 91-96.
- Sun, M., Gross, K., Schiestl, F. P. 2014. Floral adaptation to local pollinator guilds in a terrestrial orchid. *Annals of botany* 113: 289-300.
- Sun, M., Schlüter, P. M., Gross, K., Schiestl, F. P. 2015. Floral isolation is the major reproductive barrier between a pair of rewarding orchid sister species. *Journal of evolutionary biology* 28: 117-129.
- Swarts, N. D., Dixon, K. W. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of botany* 104: 543-556.
- Trávníček, P., Jersáková, J., Kubátová, B., Krejčíková, J., Bateman, R. M., Lučanová, M., Krajníková, E., Těšitelová, T., Štípková, Z., Amardeilh, J.-P., Brzosko, E., Jermakowicz, E., Cabanne, O., Durka, W., Efimov, P., Hedrén, M., Hermosilla, C. E., Kreutz, K., Kull, T., Tali, K., Marchand, O., Rey, M., Schiestl, F. P., Čurn, V., Suda, J. 2012. Minority cytotypes in European populations of the *Gymnadenia conopsea* complex (*Orchidaceae*) greatly increase intraspecific and intrapopulation diversity. *Annals of botany* 110: 977-986.
- Van der Cingel, N. A. 2001. An atlas of orchid pollination. European orchids. CRC Press, Rotterdam.
- Vöth, W. 2000. *Gymnadenia*, *Nigritella* und ihre Bestäuber. *Journal Europäischer Orchideen*. 32: 547-573.

Kasutatud veebilehekülg

Eesti Punane Raamat. 2008. Eesti Teaduste Akadeemia Looduskaitse Komisjon.
<http://elurikkus.ut.ee/prmt.php> (20. veebruar 2015).

Lisad

Lisa 1 Indiviidide ja populatsioonide morfoloogiliste tunnuste keskvärtused (X), standardhälved (SD) ja standardvead (SE) taksonitel *G. odoratissima* ja *G. conopsea* ssp. *conopsea*. Tunnuste tähised tabelis 5.

Tunnus	<i>G. odoratissima</i> n _{ind} = 60, n _{pop} = 4			<i>G. conopsea</i> ssp. <i>conopsea</i> n _{ind} = 86, n _{pop} = 7		
	X	SD	SE	x	SD	SE
TaK (cm) ind	29,18	6,77	0,87	45,99	10,85	1,17
TaK (cm) pop	29,18	4,63	2,32	46,31	6,41	2,42
ÕkP (cm) ind	5,91	1,65	0,21	10,69	3,89	0,42
ÕkP (cm) pop	5,91	0,30	0,15	11,09	2,52	0,95
ÕiA (õit) ind	36,65	14,47	1,87	39,88	14,35	1,55
ÕiA (õit) pop	36,65	6,44	3,22	40,65	7,42	2,81
ÕkT (õit/cm) ind	6,19	1,70	0,22	3,87	1,24	0,13
ÕkT (õit/cm) pop	6,19	1,01	0,50	3,81	0,66	0,25
LeA ind	7,60	1,82	0,23	7,26	1,71	0,18
LeA pop	7,60	0,85	0,43	7,30	0,85	0,32
LeP (cm) ind	11,68	3,69	0,48	15,54	3,94	0,42
LeP (cm) pop	11,68	2,90	1,45	15,85	2,59	0,98
LeL (cm) ind	0,48	0,12	0,02	0,93	0,31	0,03
LeL (cm) pop	0,48	0,05	0,02	0,91	0,20	0,07
ÕiP (mm) ind	4,26	0,66	0,09	9,12	1,27	0,14
ÕiP (mm) pop	4,26	0,25	0,13	9,10	0,71	0,27
ÕiL (mm) ind	7,30	0,76	0,10	12,26	1,86	0,20
ÕiL (mm) pop	7,30	0,34	0,17	11,92	1,50	0,57
HuP (mm) ind	2,34	0,41	0,05	4,47	0,59	0,06
HuP (mm) pop	2,34	0,27	0,13	4,56	0,39	0,15
HuL (mm) ind	2,80	0,46	0,06	6,32	0,99	0,11
HuL (mm) pop	2,80	0,27	0,14	6,22	0,67	0,25
KaP (mm) ind	3,81	0,51	0,07	15,84	1,68	0,18
KaP (mm) pop	3,81	0,30	0,15	16,00	0,70	0,26

Lisa 1 järg Indiviidide ja populatsioonide morfoloogiliste tunnuste keskvaärtused (X), standardhälved (SD) ja standardvead (SE) taksonitel *G. conopsea* ssp. *densiflora* ja *Gymnadenia* s.l. selge määranguta taimede (G. x). Tunnuste tähised tabelis 5.

Tunnus	<i>G. conopsea</i> ssp. <i>densiflora</i> n _{ind} = 52, n _{pop} = 6			G. x n _{ind} = 24, n _{pop} = 5		
	X	SD	SE	X	SD	SE
TaK (cm) ind	54,62	12,65	1,75	55,08	12,27	2,51
TaK (cm) pop	55,84	8,88	3,62	55,80	7,19	3,22
ÕkP (cm) ind	13,20	3,57	0,49	13,50	4,86	0,99
ÕkP (cm) pop	13,70	2,35	0,96	13,13	3,49	1,56
ÕiA (õit) ind	80,94	32,91	4,56	63,88	22,28	4,55
ÕiA (õit) pop	87,74	24,45	9,98	64,61	14,24	6,37
ÕkT (õit/cm) ind	6,17	1,77	0,25	4,82	0,92	0,19
ÕkT (õit/cm) pop	6,39	0,78	0,32	5,04	0,81	0,36
LeA ind	10,50	2,20	0,31	9,21	1,84	0,38
LeA pop	10,83	1,20	0,49	8,86	0,95	0,43
LeP (cm) ind	20,06	3,69	0,51	17,94	3,62	0,74
LeP (cm) pop	20,41	2,08	0,85	18,79	2,73	1,22
LeL (cm) ind	1,61	0,43	0,06	1,37	0,30	0,06
LeL (cm) pop	1,63	0,21	0,09	1,38	0,10	0,04
ÕiP (mm) ind	9,77	1,43	0,20	9,46	1,23	0,25
ÕiP (mm) pop	9,39	1,20	0,49	9,48	0,49	0,22
ÕiL (mm) ind	13,13	2,20	0,31	12,04	1,69	0,34
ÕiL (mm) pop	12,34	2,33	0,95	11,90	0,73	0,33
HuP (mm) ind	4,64	0,62	0,09	4,93	0,68	0,14
HuP (mm) pop	4,51	0,57	0,23	4,74	0,56	0,25
HuL (mm) ind	7,21	1,10	0,15	6,35	0,92	0,19
HuL (mm) pop	6,87	1,12	0,46	6,36	0,34	0,15
KaP (mm) ind	15,36	1,91	0,26	15,75	2,42	0,49
KaP (mm) pop	14,98	1,22	0,50	16,00	1,39	0,62

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadri Kuusksalu,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Morfoloogiline ja geneetiline varieeruvus perekonna *Gymnadenia* Eesti populatsioonides,

mille juhendaja on Tatjana Oja,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **28.05.2015**