

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Botaanika osakond

Jekaterina Aida

**Russowi sõrmkäpa (*Dactylorhiza russowii*) geneetiline
varieeruvus ning liigi identiteet**

Magistritöö

Juhendaja: Ph.D. Tatjana Oja

Tartu 2016

INFOLEHT

Russowi sõrmkäpa (*Dactylorhiza russowii*) geneetiline varieeruvus ning liigi identiteet

Russowi sõrmkäpp on väga varieeruv orhidee ning Eestis ei ole seda varem uuritud. Töö eesmärgiks on võrrelda Russowi ja temale väga lähedase liigi lapi sõrmkäpa (*D. lapponica*) morfoloogilist varieeruvust. Samuti tuvastada kas Russowi sõrmkäpp eristub geneetiliselt kahest lähedasest liigist: lapi sõrmkäpp (*D. lapponica*) ja ahtalehine sõrmkäpp (*D. traunsteineri*). Morfoloogiliste tunnuste analüüsiks viidi läbi välitööd 12 populatsioonis üle Eesti. Geneetilise varieeruvuse tuvastamiseks kasutati mikrosatellitanalüüsi meetodit ning analüüsiks kasutati 321 indiviidi 19 populatsioonist Eestist, Karjalast ning Austriast. Tulemuseks leiti, et Russowi sõrmkäpa geneetiline varieeruvus on kõrgem kui tema lähedastel liikidel. Morfoloogiliste tunnuste alusel *D. russowii* ja *D. lapponica* eristusid hästi, kuid antud populatsioonide geneetiline varieeruvus selgelt ei eristunud. Käesoleva töö tulemused on kooskõlas varem tehtud uuringutega ja nende pakkumisega tunnistada kolm lähedast liiki (*D. russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) üheks taksoniks *D. majalis* ssp. *lapponica*.

Märksõnad: *Dactylorhiza russowii*, morfoloogiline varieeruvus, geneetiline mitmekesisus

Genetic diversity and species identity of *Dactylorhiza russowii*

Narrow-leaved marsh orchid (*Dactylorhiza russowii*) is morphologically variable orchid and in Estonia it is not previously studied. The aim of this study was to assess and compare *D. russowii* and the Lapland marsh orchid (*D. lapponica*). Also to identify *D. russowii* and closely related *D. lapponica* and *D. traunsteineri* genetic variation. Different morphometric analyses were performed with 12 measured variables of 216 individuals from 12 population all over Estonia. Microsatellite analysis was used to evaluate genetic variability in 321 individuals from 19 populations from Estonia, Karelia, and Austria. We found that genetic variability of *D. russowii* was higher than in close related *D. lapponica* and *D. traunsteineri*. *Dactylorhiza russowii* and *D. lapponica* morphologically well differentiated, but genetic differentiation of their populations was small. Our results are consistent with earlier studies and support the recognition of three close species (*D. russowii*, *D. lapponica* and *D. traunsteineri*) as one taxon *D. majalis* ssp. *lapponica*.

Keywords: *Dactylorhiza russowii*, morphological variation, genetic variability

Sisukord

Sissejuhatus	1
1. Perekonna sõrmkäpp (<i>Dactylorhiza</i>) üldiseloomustus	2
1.1 Taksonoomia perekonnas <i>Dactylorhiza</i>	2
1.2 <i>Dactylorhiza traunsteineri/lapponica</i> kompleks	4
1.2.1 <i>Dactylorhiza russowii</i> morfoloogia, ökoloogia ja levik	4
1.2.2 <i>Dactylorhiza russowii</i> eristamistunnused lähedastest liikidest	6
1.3 <i>Dactylorhiza traunsteineri/lapponica</i> kompleksi geneetiline mitmekesisus	7
2. Töö eesmärgid	8
3. Materjal ja meetodika	9
3.1 Välitööde meetodika	9
3.2. DNA eraldamine	11
3.3. Mikrosatelliitide analüüs	12
3.2.2 Praimerite andmed ning PCR	12
3.2.3. Mikrosatelliitide fragmentanalüüs	14
3.4. Andmete analüüs	15
3.4.1 Morfoloogiliste andmete analüüs	15
3.4.2. Geneetiliste andmete analüüs	15
4. Tulemused	17
4.1 <i>Dactylorhiza russowii</i> ja <i>D. lapponica</i> morfoloogiliste tunnuste võrdlus	17
4.2 Analüüsitud taksonite geneetiline varieeruvus	29
4.2.1 Mikrosatelliitide varieeruvus	29
4.2.2 Plastiidide ja ITS alleelide varieeruvus	35
5. Arutelu	41
5.1 Uuritud liikide morfoloogiline varieeruvus	41
5.2 Analüüsitud liikide geneetiline mitmekesisus ning eristumine	42
5.2.3 Russowi sõrmkäpa (<i>Dactylorhiza russowii</i>) identiteet	43
Kokkuvõte	45
Summary	46
Tänuõnad	47
Kasutatud kirjandus	48
Lisad	52

Sissejuhatus

Sagedasti toimuva liikidevahelise hübriidiseerumise ja suure morfoloogilise varieeruvuse tõttu peetakse sõrmkäpa ehk *Dactylorhiza* perekonda taksonoomiliselt väga keeruliseks. Viimase kümnendi jooksul on perekonda *Dactylorhiza* liikidevaheliste suhete mõistmiseks uuritud geneetilist mitmekesisust erinevate molekulaarsete markerite abil, kuid üksmeelt perekonna taksonoomias pole veel saavutatud.

Russowi sõrmkäpp (*Dactylorhiza russowii*) on *Dactylorhiza* perekonna üheks varieeruvaimaks esindajaks. Russowi sõrmkäpp on evolutsiooniliselt noor allotetraploid, mis kujunes kahe diploidse liigi hübriidiseerumisel. Kõiki allotetraploide, mis pärinevad hübriidiseerumisest *D. incarnata* (L.) Soó s.l. ja *D. maculata* s.l. liinide vahel tuleb käsitleda kui *D. majalis* (Rchb.) P.F. Hunt & Summerh. s.l. (sensu lato) alamliike (Pedersen et al. 2003). Niisiis mitmete uurijate poolt tunnustatakse sellist nimetust nagu *D. majalis* ssp. *russowii*. Russowi sõrmkäpa taksonoomilist staatust läbi ajaloo pole kõik autorid käsitlenud ühtemoodi. Tema esmakirjeldaja Johannes Klinge (1899) on kirjeldanud Russowi sõrmkäpa piires 20 teisendit, 35 vormi ja 18 alamvormi, mis viitab liigi ulatuslikule varieeruvusele.

Ulatuslik morfoloogiliste tunnuste varieeruvus ning lähedaste liikide olemasolu raskendab liigi eristamist. Russowi sõrmkäpp on morfoloogiliselt sarnane ja omab kattuvat areaali järgmiste liikidega: ahtalehine sõrmkäpp - *D. traunsteineri*, lapi sõrmkäpp - *D. lapponica* ja *D. curvifolia* (eestikeelse nimeta). Neid liike ühendatakse *D. traunsteineri* kompleksi, mida on uuritud nii morfoloogiliselt (Andersson 1996) kui geneetiliselt (Nordström & Hedrén 2008, 2009). Viimase aja saadud tulemuste järgi on uuritud kolme morfoloogiliselt sarnaseid taksoneid *D. majalis* ssp. *traunsteineri*, *D. majalis* ssp. *lapponica* ja *D. majalis* ssp. *russowii* soovitatakse ühendada ühte alamliiki – *D. majalis* ssp. *lapponica* (Nordström & Hedrén 2008, 2009).

Käesoleva töö eesmärgiks on võrrelda Russowi sõrmkäpa ja lapi sõrmkäpa morfoloogilist varieeruvust Eesti populatsioonides. Samuti on eesmärgiks tuvastada *D. russowii* liigisisest geneetilist varieeruvust Eesti populatsioonides ning võrrelda geneetilist mitmekesisust teiste lähedaste liikidega (*D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) ning samuti tuvastada, kas Russowi sõrmkäpp eristub geneetiliselt teistest lähedastest liikidest. Samuti tuvastada kas geneetilise mitmekesisuse jaotus on seotud populatsioonide geograafilise asukohaga.

1. Perekonna sõrmkäpp (*Dactylorhiza*) üldiseloomustus

Sõrmkäpp ehk *Dactylorhiza* on käpaliste (*Orchidaceae*) sugukonda kuuluv perekond, mis on laialt levinud põhjapoolkeral. Erinevate uurijate andmete järgi eristatakse perekonnas 12 kuni 75 liiki (Pedersen 1998; Averyanov 1990). Enamus sõrmkäpa perekonda kuuluvaid liike ehk 58 esindajat leidub Euroopas, Põhja-Aafrikas ja Lähis-Idas, seejuures kõige rohkem neid on Loode-Euroopas (Delforge 2001). Eristatakse *Dactylorhiza* kolme mitmekesisuse tsentrit – Lääne-Euroopa (kuuluvad ka Briti saared, Saaremaa ja Skandinaavia lõunaosa), Karpaatia Balkani piirkond ja Väike-Aasia (Averyanov 1990).

Perekonna ladinakeelne nimetus tuleneb kreekakeelsetest sõnadest *dactylos* – sõrm, *rhiza* – juur, sõrmjalt lõhestunud juuremugulate järgi (Kuusk 1984). Sõrmkäpad on mitmeaastased, mitmeti lõhestunud juuremugulatega taimed. Püstisele varrele, mis on enam-vähem üleni lehistunud, kinnituvad süstjad leherootsudetad lehed. Lehetuped ümbritsevad tihedalt vart. Lehed võivad olla kas laikudega, täppidega või ilma nendeta. Taimede ülemised lehed meenutavad kandlehti ja võivad ulatuda õisikuni. Õied on kannusega ning kolmehölmalise huulega, mis on suunatud alla poole. Õisikud on tavaliselt paljuõielised ja tihedad, kuid leidub ka hõredate väheõieliste õisikutega taimi. Õisikud on kujult kas munajad, püramiidjad või ruljad. Välimised perigoonilehed asetsevad kiivritaoliselt, püstiselt või laiuvalt ja on peaaegu ühesuurused. Sisemised külgmised perigoonilehed on välimistest väiksemad. Gümnoostemium on lühike ning esineb keerdunud sigimik. Tolmuterade tetraadid on polliniumides elastselt seotud (Kuusk 1984).

1.1 Taksonoomia perekonnas *Dactylorhiza*

Dactylorhiza perekonna eripäraks on liikide vahel toimuv aktiivne hübriidiseerumine (Dressler 1981, Averyanov 1991). Sõrmkäpa perekonna esindajad hübriidiseeruvad omavahel ja võivad tagasi ristuda oma vanemliikidega (Delforge 2006; Hedrén 2003). Seetõttu sõrmkäpa liigid varieeruvad suuresti morfoloogiliselt ning liikidevaheliste erinevuste välja selgitamine on keeruline (Hedrén 2001; Shipunov et al. 2004).

Molekulaarsete uringute käigus, mis põhinesid ITS sekveneerimisel (Bateman et al. 2003) ja AFLP analüüsidel (Hedrén 2002), tehti järeldus, et *Dactylorhiza* perekond koosneb viiest grupist (Bateman & Denholm 2003, Bateman et al., 2003). Need viis gruppi on järgmised:

1. *Dactylorhiza incarnata* (kahkjaspunane sõrmkäpp) grupp, kuhu kuuluvad diploidsed liigid - *D. euxina* ja *D. umbrosa*
2. *Dactylorhiza maculata* (kuradi-sõrmkäpp) grupp, kuhu kuuluvad diploidsed liigid – *D. fuchsii* (vööthuul-sõrmkäpp), *D. saccifera*, *D. foliosa* ja *D. maculata* (kuradi-sõrmkäpp) (autotetraploid)
3. *Dactylorhiza majalis* grupp, kuhu kuuluvad allotetraploidsed liigid – *D. traunsteineri*, *D. baltica* (Balti sõrmkäpp), *D. russowii* (Russowi sõrmkäpp), *D. praetermissa* (lääne-sõrmkäpp), *D. purpurella* ja nendega seotud liikidevahelised hübriidtaksonid.
4. *Dactylorhiza sambucina* (leeder-sõrmkäpp) grupp, kuhu kuuluvad diploidsed liigid – *D. romana* ja *D. flavescens*
5. „primitiivsed diploidid“ – *D. aristata*, *D. iberica* ja *D. viridis* (= *Coeloglossum viride*) (rohekas õõskeel).

Euraasia *D. incarnata/maculata* polüploidises kompleksis eristub kolm põhilist vanemliini – *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo s.l. (sensu lato), *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo s.l. ning *Dactylorhiza euxina* (Nevski) Czerep. (Ståhlberg & Hedrén 2008). Neist kaks esimest vanemliiki esinevad Euroopas. *D. incarnata* s.l. sisaldab ainult diploidseid ($2n=40$) (Averyanov 1990b) ning *D. maculata* s.l. nii diploidseid kui ka autotetraploidseid taksonid. On tõestatud, et enamus allotetraploidseid taksonid *Dactylorhiza* perekonnas on tekkinud korduva omavahelise hübriidiseerumise teel vanemliikidest *D. maculata* (kuradi-sõrmkäpp) s.l. ja *D. incarnata* (kahkjaspunane sõrmkäpp) s.l. (Devos et al., 2003, Hedrén et al., 2008, Nordström and Hedrén 2008). Peaaegu alati *D. maculata* s.l. on emasvanem ja *D. incarnata* s.l. on õietolmu allikas ehk isasvanem (Devos et al. 2003; Hedrén 2003; Hedrén et al. 2008). Allotetraploidseid ($2n=80$) taksonid iseloomustab elujõulisus ja morfoloogiliste tunnuste kombinatsioon, mis on päritud *D. maculata* ja *D. incarnata* liikidelt (tavaliselt päritakse õõnsat vart *D. incarnata*-lt ja laigulisi lehti *D. maculata*-lt) (Paun et al. 2010).

Mõned autorid aktsepteerivad morfoloogiliselt erinevaid allotetraploidseid vorme kui erinevaid liike (nt Averyanov 1990b), teised (Bateman & Denholm 1983; Hedrén 2001) aga on veendunud, et paljud neist on *D. majalis* s.l. alamliigid. Pedersen et al. (2003) töös tuuakse välja, et kõiki allotetraploide, mis pärinevad hübriidiseerumisest *D. incarnata* (L.) Soó s.l. ja *D. maculata* s.l. liinide vahel tuleb käsitleda kui *D. majalis* (Rchb.) P.F. Hunt & Summerh. s.l. alamliike.

1.2 *Dactylorhiza traunsteineri/lapponica* kompleks

Dactylorhiza majalis allotetraploidide gruppi, mis on laialt levinud Euroopas ja Aasias (Pillon et al. 2007), kuulub *Dactylorhiza traunsteineri/lapponica* kompleksi. *Dactylorhiza traunsteineri* kompleksi kuuluvad peale *D. traunsteineri* ka teised laialt tunnustatud liigid nagu *Dactylorhiza russowii* (Klinge) Holub, *D. curvifolia* (Nyl.) Czer. ja *D. lapponica* (Laest.) Soó (Averyanov 1990, Tzvelev 2000). Fennoskandias ning Balti aladel neid kolm allotetraploidi (*D. russowii*, *D. lapponica* ning *D. traunsteineri*) peetakse väga lähedasteks (de Soó 1980; Andersson 1994).

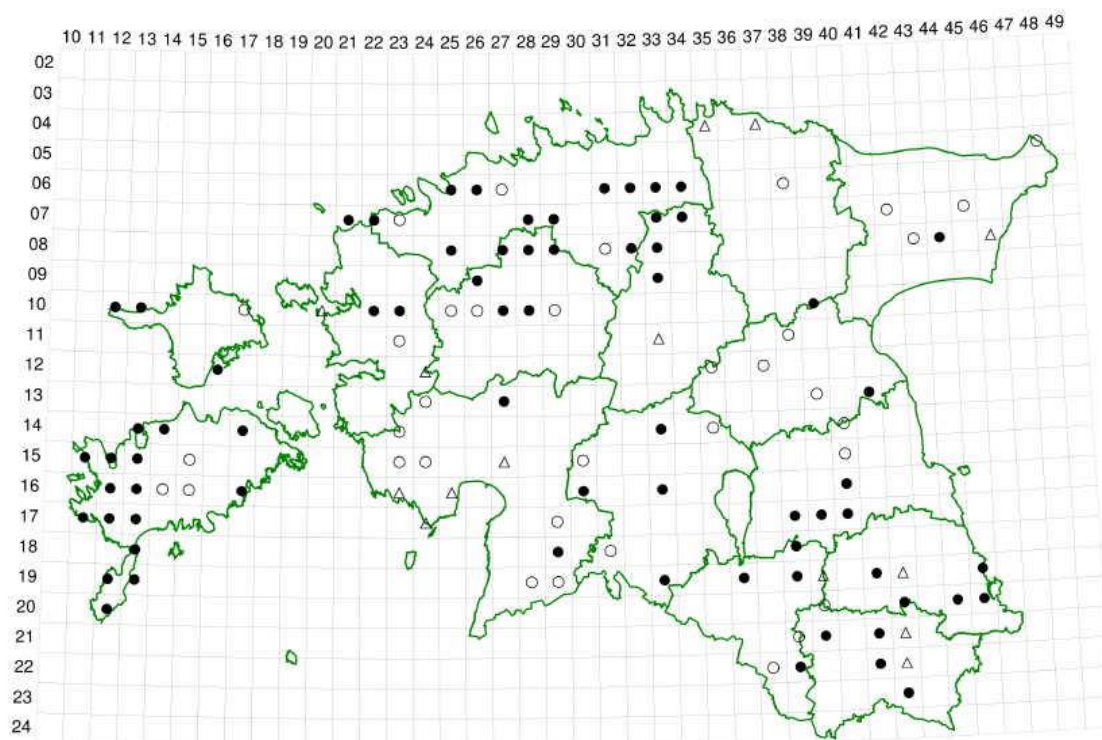
Antud kompleksi liigid, ei ole mitte ainult morfoloogiliselt sarnased, vaid omavad ka kattuvat levikuala. Ahtalehise sõrmkäpa ja Russowi sõrmkäpa taimed on Euroopa-Siberi levikuga ning kasvavad Skandinaavias, Põhja- ja Kesk-Euroopas, Ida-Euroopa põhja- ja keskosas ning Lääne-Siberis (Paun et al. 2011; Vakhrameeva et al. 2008). Märgitakse ka et, ahtalehise sõrmkäpa põhilisemateks levialadeks on Alpid, Briti saared ja Fennoskandia (Nordström & Hedrén 2009). Samuti on lapi sõrmkäpp (*D. lapponica*) levinud Skandinaavias põhjapoolsematel aladel ning mägi-aladel (Andersson 1996). Samal ajal kui *D. russowii* võib leida Balti riikidest ja Venemaalt (Nordström & Hedrén 2008) ning ta on üldiselt idapoolsema levikualaga kui *D. traunsteineri* (Andersson 1996).

1.2.1 *Dactylorhiza russowii* morfoloogia, ökoloogia ja levik

Russowi sõrmkäpad on mitmenäolised taimed (Lisa 1), kaheks lõhestunud juuremugulaga ning 25-35 (50) cm kõrged. Vars on püstine või veidi kõverdunud, peenike, ülasaosas violetjas. Varrel on enam-vähem ühtlaselt jaotunud rohelist varrelehti tavaliselt 3 või 4. Kujult on lehed lineaalsed või lineaalsüstjad. Lehed võivad olla pealispinnalt täppidega, harvemini on nad ebaselged või puuduvad. Sageli on kõik või ainult alumised lehed kaarjad, harva kõik sirged ja püstiselt kaldu (Kuusk 1984). Russowi sõrmkäpale on iseloomulik, et alumised ja keskmised lehed on alusel veidi ahenenud ja enamasti alla 1 cm laiad. Alumised ja keskmised lehed on 7,5-12 (15) cm pikad ja 6-10 (12) mm laiad, üsna lamedad kuni sügavalt renjad, ahenenud ümara tipuga. Ülemine leht lühem, sageli kõrglehe taoline, peaaegu või üldse mitte õisiku aluseni ulatuv (Kuusk 1984). Kandlehed on violetjad ning õitest lühemad, ainult kõige alumistel õitel võivad nad olla kas õite pikkused või veidi pikemad, olles seejuures 1,5-2,5 cm pikad (Kuusk 1984). Suhteliselt suured õied paiknevad võrdlemisi hõredas ja väheseõielises 5 cm pikkuses õisikus, mis koosneb tavaliselt 7-11 (14) õiest (Vakhrameeva et al. 2008). Silmapaistvad õied on enamasti intensiivselt tumevioletsed, mõnikord punakasvioletsed ning lõhnatud. Averyanovi järgi (1990b) on huul 7-8 mm pikk ja 7-12 mm lai, üldkujult peaaegu ümar ning keskkohast kõige laiem. Kuusk (1984) märgib, et huul on ebaselgelt

kolmehõlmaline väikese keskmise hõlmaga ning tume-purpurpunase kirjaga. Pikner (2013) mainib huulemustrit kui kõige mitmekesisemana sõrmkäppade seas: „enamasti mitme-kordne topeltsilmusega tumevioletjas joonmuster kulgeb üle mõlema külghõlma. Joonmuster enamasti ka keskmisel hõlmal, lisaks esineb täppmustrit, keskosal veidi heledam väli.“ Kannus on 6-8 (9) mm pikk (Averyanov 1990b), violetne ning avar, ümara ahenenud tipuga ja kaldu allapoole suunatud. Vili umbes 1,2 cm pikk ja 4 mm lai (Kuusk 1984).

Russowi sõrmkäpp on pärismaine liik (Kukk & Kull 2005) ning levinud hajusalt üle Eesti (joonis 1). Leiukohtade hulk on viimastel aastakümnetel vähenenud. Eesti taimede levikuatlase järgi, mis floora kaardistamiseks kasutab võrgustikku, milles iga ruut on suurusega 6'x10', on liiki aastatel 1971 - 2005 leitud 69 ruudus (Kukk & Kull 2005).



Joonis 1. Russowi sõrmkäpa (*Dactylorhiza russowii*) levikukaart Eestis (Kukk ja Kull 2005). Tingmärgid: ○ – leitud 1921-1970; ● – leitud 1971 ja hiljem.

Russowi sõrmkäpp õitseb juunist juuli alguseni (Averyanov 1990b). Levib seemnetega ja vegetatiivne paljunemine ei mängi olulist rolli populatsiooni püsijäämises (Tatarenko 1996).

Käpaline kasvab soistel niitudel, allika- ning madalsoodes (Kuusk 1984), eelistades lubjarikast ja neutraalset mulda (Kull & Tuulik 2002), valguslembeline. Samuti võib liiki leida soiste veekogude

kallastelt (Kuusk 1984). Taim on väga tundlik soode ja soostunud niitude kuivendamise, tallamise ja muldkate häirimise suhtes (Vakhrameeva et al., 2008). Russowi sõrmkäpp on Eestis II kaitsekategooria kaitsealune liik (eElurikkus).

1.2.2 *Dactylorhiza russowii* eristamistunnused lähedastest liikidest

Esmakordselt kirjeldati Russowi sõrmkäppa kui *Orchis angustifolia* Lois. Ex Reichenb. var. *russowii* Johannes Klinge väitekirjas 1893. aastal ning nimetati taim Tartu Ülikooli botaanika-professori Edmund Russowi auks. Johannes Klinge (1899) pani tähele Russowi sõrmkäpale iseloomuliku muutliku õite kuju, mustrit ning vormirohkust ja kirjeldas selle liigi piires 20 teisendit, 35 vormi ja 18 alamvormi.

Russowi sõrmäpa taksonoomilist staatust on aja jooksul muudetud. Averyanovi (1990b) poolt liik *D. traunsteineri* s.l oli esmalt jagatud kolmeks liigiks – ahtalehine sõrmkäpp (*D. traunsteineri*), Russowi sõrmkäpp (*D. russowii*) ja *D. curvifolia* (eestikeelne nimi puudub). Hiljem Averyanov (2000) tegi Russowi sõrmkäpast varieteedi - *D. traunsteineri* var. *russowii* (Klinge) Aver. Vakhrameeva jt (2008) järgi on ahtalehisel sõrmkäpal (*D. traunsteineri*) üks alamliik (subsp. *russowii*) ning neli varieteeti (var. *curvifolia*, var. *lapponica*, var. *russowii*, var. *traunsteineri*).

Dactylorhiza russowii eristamiseks teistest lähedastest liikidest kasutatakse sageli üsna vastuolulisi morfoloogilisi tunnuseid, näiteks taime kõrgust, kaarjaid lehti, kasvukohta või geograafilist piirkonda (Averyanov 1990b, 2000). Näiteks, Smoljaninova (1976) iseloomustas *D. russowii* kui kaarjalt painduvate ning ümara tipuga lehtedega taime. Soó järgi (1980), *D. russowii* on sarnane *D. traunsteineri*-ga, kuid juuremugulad ei ole piklikud, õisik on tihe, õied on roosad ja huule keskmine hõlm on kolmnurkne. Averyanov (1990b) kirjeldab Russowi sõrmkäpa kui jõulise kasvuga, paksu ja õõnsa varrega ning süstjate lehtedega taime. Hilisemas publikatsioonis, kus liik on muudetud varieteediks (*D. traunsteineri* var. *russowii*), märgib ta taksonil suuremad õied ja laiemad lehed (Averyanov 2000). Paljud autorid (Schmeidt 1996, Kull & Tuulik 2002, Vakhrameeva et al. 2008) märgivad, et *D. russowii* oluliseks erinevuseks teistest lähedastest liikidest on suhteliselt suured õied, mille diameeter võib ulatuda kuni 20 mm. Õied on enamasti erksavärvilised (Vakhrameeva et al. 2008) ning väga muutlikud, olles nii heledama kui tumedama värvusega (Schmeidt 1996). Õied võivad olla roosakaspunased, purpurpunased või violetjad (Schmeidt 1996).

Mitmed autorid on maininud *D. russowii* selget eristumist teistest lähedastest liikidest pikkade ja väga kitsaste lehtede poolest, mis on kogu lehe ulatuses ühelaiused (alla 1 cm) (Tuulik 1998, Kull & Tuulik 2002, Vakhrameeva et al. 2008). Teine tähtis tunnus, et alumised ja keskmised lehed on

aluse suunas veidi ahenevad (Kuusk 1984). Veel on esmakirjeldaja J. Klinge (1899) märkinud oluliseks tunnuseks küllaltki kaarjaid lehti. Ka NSV Flooras mainitakse, et oluline erinevus, mis leiti *D. traunsteineri* s.l. taksonite vahel oli see, et lehed on kaardunud (põhjapoolsetel taimedel) või püstised (läänepoolsetel, samuti ka Balti regiooni taimedel) (Kuusk 1984). Kui Russowi sõrmkäpa lehtede omapärane ühelaiuselisus on peaaegu kindel tunnus, siis lehtede pikkus võib varieeruda. Täheledatai nii 8-12 cm (Schmeidt 1996), kui ka 6-14 cm pikkuseid (Vakhrameeva et al., 2008) lehti.

Märgitakse, et Russowi sõrmkäppade lehed võivad olla kas täpidega või ka ilma. Vakhrameeva jt (2008) töös märgiti täppide puudumist kui *D. russowii* head eristamistunnust teistest lähedastest liikidest. Samas see on vastuolus teiste autorite (Schmeidt 1996, Tuulik 1998, Kull & Tuulik 2002, Kuusk 1984) taime kirjeldustega. Nordström & Hedrén (2008) uuringus täheledatai, et lehtede täpilisust ei saa lugeda väga iseloomulikuks tunnuseks, sest see varieerub suurel määral nii populatsioonisiselt kui ka populatsioonide vahel.

Russowi sõrmkäpp ristub teiste sõrmkäppadega, eriti aktiivselt kuradi-sõrmkäpaga (*D. maculata*), kahkjaspunase sõrmkäpaga (*D. incarnata*) (Tuulik 1998) ning vööthuul-sõrmkäpaga (*D. fuchsii*) (Kukk & Kull 2005). Lisaks neile Eesti NSV floora (1984) mainib järgmist hübriidi – *D. russowii* x *D. incarnata* subsp. *cruenta*. On teada ka hübriidiseerumist hariliku käoraamatuga (*Gymnadenia conopsea*) (Kuusk 1984).

1.3 *Dactylorhiza traunsteineri/laponica* kompleksi geneetiline mitmekesisus

Kompleksi kuuluvaid liike on korduvalt uuritud erinevate molekulaargeneetiliste markerite abil. Näiteks Nordström & Hedrén (2008) analüüsisid *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri* /*laponica* kompleksi geneetilist varieeruvust Fennoskandias ning selleks uuriti kloroplasti genoomi tunnuseid. Enamus uuritud allotetraploidseid populatsioone omasid *D. maculata* s.l. haplotüüpi, mis kinnitas, et *D. maculata* on emasvanem ning seemnekandja (Devos et al., 2003, Hedrén 2003). Töös ei leitud kolme morfoloogiliselt sarnase taksoni *D. majalis* ssp. *traunsteineri*, *D. majalis* ssp. *laponica* ja *D. majalis* ssp. *russowii* geneetilist eristumist. Seega pakuti ühendada kolm taksonit ühte alamliiki – *D. majalis* ssp. *laponica*, mis toetus morfoloogiliste tunnuste uurimustöö tulemustele (Andersson 1996).

Nordström & Hedrén hilisemas (2009) töös uuriti *D. majalis* ssp. *traunsteineri* geneetilist varieeruvust ja allotetraploidide omavahelisi suhteid kaasates ka ulatuslikumat esinemisala ja lähedaste liike suuremat proovide arvu, et uurida tervet ssp. *traunsteineri* levikuala (Alpid,

Skandivaavia ja Britannia). Uurimuse tulemus näitas, et liigikompleksi geneetiline varieeruvus ei ole geograafiliselt struktureeritud.

2. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks on:

1. Hinnata ja võrrelda Russowi sõrmkäpa (*Dactylorhiza russowii*) ja lapi sõrmkäpa (*Dactylorhiza lapponica*) morfoloogilist varieeruvust Eesti populatsioonides.
2. Tuvastada Russowi sõrmkäpa (*D. russowii*) liigisisest geneetilist varieeruvust Eesti populatsioonides ning võrrelda geneetilist mitmekesisust teiste lähedaste liikidega: lapi sõrmkäpaga (*Dactylorhiza lapponica*) ja ahtalehise sõrmkäpaga (*Dactylorhiza traunsteineri*).
3. Tuvastada kas liikide geneetilise mitmekesisuse jaotus on seotud populatsioonide geograafilise asukohaga.

3. Materjal ja meetodika

3.1 Välitööde meetodika

Dactylorhiza russowii morfoloogilise ning geneetilise varieeruvuse uurimiseks viidi läbi välitööd 2015. aastal Eestis ning Karjalas. *Dactylorhiza traunsteineri* proovid tüüpleiukohas Kitzbüheli lähedal Austrias olid kogutud 2014. aastal. Kolmes populatsioonis tuvastati ka hübriide kahkjaspunase (*Dactylorhiza incarnata*), balti sõrmkäpaga (*Dactylorhiza baltica*) ning kuradi-sõrmkäpaga (*Dactylorhiza maculata*). Kokku on uuritud 19 populatsiooni Põhja- ning Lõuna-Eestis, Saaremaal, Karjalas ning Austrias, mille andmed on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Uuritud populatsioonide iseloomustus. Sulgudes on toodud andmeanalüüsis kasutatavad lühendid.

Liik	Asukoht	Populatsioon ja selle lühend sulgudes	Analüüsitavate isendite arv (morfoloogiliselt / geneetiliselt)	Kasvukoht	Populatsioonis kaasnevad sõrmkäpaliigid
<i>Dactylorhiza russowii</i>	Põhja-Eesti	1. Palivere (RuPa)	20 / 14	Allikasoo	<i>D. fuchsii</i> , <i>D. maculata</i>
		2. Kaasiku (RuKa)	20 / 17	Allikasoo	<i>D. incarnata</i> , <i>D. maculata</i> , <i>D. fuchsii</i> , <i>D. cruenta</i>
		3. Keila (RuKe)	20 / 18	Madal soo	<i>D. incarnata</i>
		4. Pikavere (RuPi)	11 / 10	Allikasoo	<i>D. incarnata</i>
	Lõuna-Eesti	5. Tatra (RuTa)	20 / 18	Allikasoo	<i>D. incarnata</i> ja <i>D. baltica</i> (valdavalt) ning vähe <i>D. cruenta</i> , <i>D. fuchsii</i> ja <i>D. maculata</i>
		6. Päidlapalu (RuPd)	24 / 21	Allikasoo	<i>D. fuchsii</i> ja <i>D. incarnata</i> (valdavalt) ning <i>D. baltica</i> .
		7. Põlva (RuPo)	16 / 13		<i>D. fuchsii</i> , <i>D. incarnata</i> , <i>D. baltica</i>
	Saaremaa	8. Iide (RuIi)	15 / 14	Allikasoo	Vähe <i>D. incarnata</i> ja <i>D. baltica</i>
		9. Kugalepa (RuKu)	15 / 17	Allikasoo	<i>D. russowii</i> (lehed ei ole täpilisid)
		10. Viieristi (RuVi)	15 / 19	Allikasoo	<i>D. maculata</i>
		11. Viidu (RuVd)	15 / 20	Allikasoo	

Liik	Asukoht	Populatsioon ja selle lühend sulgudes	Analüüsitavate isendite arv (morfoloogiliselt / geneetiliselt)	Kasvukoht	Populatsioonis kaasnevad sõrmkäpaliigid
<i>Dactylorhiza lapponica</i>	Saaremaa	12. Kugalepa 1 (LaKg)	15 / 16	Allikasoo	Vähe <i>D. incarnata</i> , <i>D. ochroleuca</i>
<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	Austria	13. Kitzbühel (TrKi)	19	Madalsoine ala järve kaldal	<i>D. majalis</i> , vähe <i>D. incarnata</i> ja <i>D. majalis x traunsteineri</i>
		14. Kitzbühel 2 (TrKi2)	11	Madalsoine ala järve kaldal	<i>D. majalis</i> , vähe <i>D. incarnata</i> ja <i>D. majalis x traunsteineri</i>
<i>Dactylorhiza praetermissa</i>	Saaremaa	15. Pilguse (PrPi)	16	Allikasoo	<i>D. incarnata</i> , vähe <i>D. ochroleuca</i> ja <i>D. baltica</i>
<i>Dactylorhiza baltica</i> var. <i>kuzkenembe</i>	Saaremaa	16. Kuusnõmme (BaKs)	21	Allikasoo	<i>D. incarnata</i>
		17. Kaarmise (BaKr)	14	Allikasoo	<i>D. incarnata</i> (vähe)
<i>Dactylorhiza maculata</i>	Karjala	18. Mandra (MaMn)	12	Madalsoo	
		19. Matrosy (MaMt)	8	Madalsoo	<i>D. incarnata</i> , <i>D. fuchsii</i>
<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	Karjala	19. Matrosy (FuMt)	11	Madalsoo	<i>D. incarnata</i> , <i>D. fuchsii</i>
<i>Dactylorhiza russowii x baltica</i>	Lõuna-Eesti	7. Põlva (RBPo)	1 / 1	Allikasoo	<i>D. fuchsii</i> , <i>D. incarnata</i> , <i>D. baltica</i>
<i>Dactylorhiza russowii x incarnata</i>	Lõuna-Eesti	7. Põlva (RIPo)	3 / 3	Allikasoo	<i>D. fuchsii</i> , <i>D. incarnata</i> , <i>D. baltica</i>
		6. Pädilpalu (RIPd)	6 / 6	Allikasoo	<i>D. fuchsii</i> ja <i>D. incarnata</i> (valdavalt) ning <i>D. baltica</i> .
<i>Dactylorhiza russowii x maculata</i>	Karjala	19. Matrosy (RxMMt)	2	Allikasoo	<i>D. incarnata</i> , <i>D. fuchsii</i>

Morfoloogiliste tunnuste mõõtmisi teostati 12 populatsioonis üle Eesti. Ühe Saaremaa Kugalepa (LaKg) populatsiooni moodustasid lapi sõrmkäpa (*D. lapponica*) tüüpi taimed, ülejäänud populatsioonides olid Russowi sõrmkäpad ning kahes Lõuna-Eesti populatsioonis tuvastati esinevad hübriidid kahkjaspunase sõrmkäpaga (*D. incarnata*) ja balti sõrmkäpaga (*D. baltica*) (Lisa 2). Mõõdetavate isendite arv sõltus populatsiooni suurusest ning taimi valiti juhuslikkuse meetodil. Iga taime puhul uuriti 12 morfoloogilist tunnust. Taimedel loendati õite ja lehtede arv ning mõõdeti iga taime kõrgust ning kahe suurima lehe pikkus ja laius. Samuti mõõdeti igal isendil

õisiku pikkus ning kolmel erineval kõrgusel õisikus paikneva õie pikkus, laius, õie huule pikkus ja laius ning kannuse pikkus. Samuti arvutati ka õisiku tihedus (õit/cm).

Tabel 2. Analüüsis kasutatavad morfoloogilised tunnused ja neile vastavad lühendid

Lühend	Tunnus
TaK	Taime kõrgus (cm)
OkP	Õisiku pikkus (cm)
OiA	Õite arv (tk)
OkT	Õisiku tihedus (õit/cm)
OiP	Õie pikkus (mm)
OiL	Õie laius (mm)
HuP	Huule pikkus (mm)
HuL	Huule laius (mm)
KaP	Kannuse pikkus (mm)
LeA	Lehtede arv (tk)
LeP	Lehe pikkus (cm)
LeL	Lehe laius (cm)

Mikrosatelliitanalüüsi jaoks koguti kokku 321 proovi 19 populatsioonist. Uuritavatelt taimedelt võeti noor ja terve, võimalikult vigastuseta umbes 2 cm² suurune lehetükk mis pandi nummerdatud teefiltri pakikesse ja hoiti silikageelis lehe täieliku kuivamiseni. Põhja- ning Lõuna-Eesti populatsioonides tehti igast uuritavast taimest nii õisiku kui ka kogu taime lähifoto (Lisa 1).

Saaremaalt ning Austriast pärit leheproovid oli kogunud Tarmo Pikner, leheproovid Karjalast oli kogunud Sergei Znamenski, Lõuna-Eesti proovid korjati koos Toomas Hirsega ning Põhja-Eesti proovid töö autori poolt.

3.2. DNA eraldamine

Silikageelis kuivanud lehtedest tehti DNA eraldamist vastavalt „Soltis Lab CTAB DNA Extraction“ protokollile (Doyle & Doyle, 1987; Cullings, 1992). Protokoll järgi eraldatud DNast tehti 1:10 lahendus (180 µl destilleeritud vett ja 20 µl eraldatud DNA), mis säilitati -18°C juures ning kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni tarvis.

3.3. Mikrosatelliitide analüüs

Mikrosatelliitanalüüs on liikide fülogeneetiliste seoste ning populatsioonide geneetilise mitmekesisuse uuringutes laialdaselt kasutatav meetod (Kalia et al. 2011). Mikrosatelliidid (Simple Sequence Repeats – SSRs) on DNA 1-6 nukleotiidi pikkused tandeemsed kordusjärjestused, mille korduste arv on kuni 100. Mikrosatellitidele on iseloomulik kodominantsus (Morgante & Olivieri 1993) ja pikkuspolümorfism (Jarne & Lagoda 1996). Mikrosatelliitanalüüsi viiakse läbi amplifitseerides DNAd polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR- polymarase chain reaction), mille jaoks on vajalik sobilikud praimerid (Kalia et al. 2011).

Mikrosatelliidid leiduvad prokarüootses ja eukarüootses genoomis nii kodeerivas kui ka mittekodeerivas regioonis (Chambers & MacAvoy 2000, Zane et al. 2002, Selkoe & Toonen 2006). Põhiliselt kasutatakse neid, mis asuvad mittekodeerivas alas (Selkoe & Toonen 2006). Mikrosatellitide järjestused on avastatud kolmes eukarüootse organismi genoomis: tuumagenoomis ning organellide genoomis (kloroplasti ja mitokondri genoom) ning taimel esineb kõik kolm erinevat genoomi (Provan et al. 2001). Töös kasutati plastiidi, tuuma ja ITS geneetilisi markereid. ITS (internal transcribed spacer) ehk transkribeeritava mittekodeeriva geenidevahelise ala piirkond, mis on emasvanema poolt päritav, laialt kasutatakse fülogeneetilise mustri selgitamiseks.

3.2.2 Praimerite andmed ning PCR

Töös on kasutatud (Nordström & Hedrén 2007; Hedrén et al. 2008, Shipunov et al. 2004, Pillon et al. 2007) mikrosatelliitide praimereid, mis olid varem optimeeritud M. Mürki poolt. Praimerite reaktsioonitingimused ja märgised on toodud tabelites 3 ning 4. Antud 13 praimeri sobivuse *D. russowii* geneetilise mitmekesisuse väljaselgitamiseks valiti 5 isendit 2 populatsioonist ning iga praimeriga viidi läbi PCR, seejärel saadud PCR-i produktid kontrolliti geelelektroforeesil. Uuritava liigi puhul töötasid 12 praimeri, millest kaks (Dfuch ja Dmac) on ITS markerid, 6 kloroplasti markerit (Dpl8, Dpl11b, Dpl10b, Dpl19, Dpl1, Dpl9) ning 4 tuuma markerit (Datr13, Datr11, Datr8, Datr14) ja nendega jätkati edasist analüüsi. Uuritavate populatsioonide hulgast 14 populatsiooni puhul rakendati proovide randomiseerimise põhimõtet, paigutades erinevate populatsioonide proove vaheldumisi 5 indiviidi kaupa igast populatsioonist.

Tabel 3. Kasutatavate praimerite andmed. F (forward) – pärisuunaline, R (reverse) – vastassuunaline.

Praimer	Seondumise temperatuur (°C)	Mg allikas	5'-märgis	Pikkus (bp)	Praimeri nukleotiidne järjestus (5'→3')
Datr13	52.4	MgSO ₄	M13	100 - 125	F-GGCATCAGGCTCTTCTTC R-AGGAAACAGCTATGACCATGA
Datr11	60.1	MgCl ₂	M13	170 - 200	F-CGCCGACAACTCTACATC R-AGGAAACAGCTATGACCATC GATCCTCAT
Datr8	53.5	MgSO ₄	CAGT	200 - 220	F-ACAGTCGGGCGTCATCAAGTG R-TGGGGATCATATTGCTTTAC
Datr14	56.4	MgSO ₄	CAGT	275 - 300	F-ACAGTCGGGCGTCATCATTG R-TGGCAAACCTTCTATCTTG
Dpl8	55.2	MgSO ₄	CAGT	75 - 100	F-CACCTAGACACTTATCATTC R-ACAGTCGGGCGTCATCACCGA
Dpl11b	55.2	MgSO ₄	CAGT	100 - 125	F-GCTATGCTTAGTGTGTGACTC R-ACAGTCGGGCGTCATCAAGTT
Dpl10b	55.2	MgSO ₄	CAGT	125 - 150	F-ACAGTCGGGCGTCATCACCGA R-GAAAGGCTTGTATTTCACAG
Dpl19	55.2	MgSO ₄	CAGT	150 - 175	F-GAGTAATAGTGTCTAATAAG R-ACAGTCGGGCGTCATCACAGA
Dpl1	55.2	MgCl ₂	CAGT	180 - 220	F-ACAGTCGGGCGTCATCACGAA R-CGTTAGAACAGCTTCCATTG
Dpl9	55.2	MgSO ₄	M13	200 - 220	F-GCTATGCTTAGTGTGTGACTC R-ACAGTCGGGCGTCATCAAGTT
Dfuch	56.4	MgCl ₂	M13	75 - 100	F-AGGAAACAGCTATGACCA TATTGAATC R-ACCGCATGACGGGCCATTCT
Dmac	56.4	MgCl ₂	M13	75 - 100	F-AGGAAACAGCTATGACCA TTGTGCCA R-TAGGAGCAAACAACCTCCACA

Tabel 4. Praimerite märgised

Märgise nimi	Nukleotiidne järjestus
M13	AGGAAACAGCTATGACCAT
CAGT	ACAGTCGGGCGTCATCA

Järgnevalt viidi läbi PCR 10 µl alljärgnevas reaktsioonisegus, kus märklaud-DNA-ks oli kasutatud eraldatud DNA kümnekordset lahjendust.

PCR reaktsioonisegu koostis:

0,6 µl GoTaqFlexi puhvrit,

1,2 µl MgSO₄ või 1,6 µl MgCl₂,

0,6 µl dNTP lahust,

0,5 µl pärisuunalist praimerit,

0,5 µl vastassuunalist praimerit,

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

0,05 µl HotFirePol DNA polümeraasi,

0,05 µl BSA,

3 – 4,4 µl destilleeritud vett (vastavalt teiste koostisosade mahule, nii et reaktsioonisegu lõppmaht oleks 10 µl),

1 – 2,5 µl märklaud-DNA-d (Datr13, Datr3 ja Dp11 puhul 2,5 µl, ülejäänute puhul 1 µl).

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 geelelektrofooresil (suure geeli valmistamiseks kasutati 0,9 g agarooosi ning 70 ml puhvrit, pannes geelile 1µl värvi ning 1 µl PCR-produkti) ning visualiseeriti UV-fluorestsentsi kapis. Seejärel säilitati -18 °C juures kuni fragmentanalüüsi läbiviimiseni.

3.2.3. Mikrosatelliitide fragmentanalüüs

Mikrosatelliitide fragmentanalüüsi tegemiseks valmistati ette PCR produktid vastavalt McGlaughlin jt (2008) protokollile. Saadud PCR produktidest tehti kümnekordsed lahjendused.

Edasi fragmentanalüüsiks tehti lahus, kus 500 µl Hi-Di formamiidile lisati 10 µl suurusstandardit LIZ500. Seejärel hästi segatud lahust pandi automaatpipetiga iga mikrotiiterplaadi kaevu 10 µl.

Siis kanti igasse plaadi kaevu 1,2 µl eelnevalt PCR-produktidest kokku pandud segu. Segu koosnes iga indiviidi 12 praimeriga saadud PCR-produktist, ühte tuubi segati kokku järgnevate praimeritega saadud PCR-produktid - 3 µl Datr13, 3 µl Dpl1, 2 µl Datr8, 2 µl Datr11, 2 µl Datr14, 2 µl Dpl11b, 0,5 µl Dpl8, 0,5 µl Dpl9, 0,5 µl Dpl10b, 0,5 µl Dpl19, 0,05 µl Dfuch ning 0,05 µl Dmac ja 4 µl vett. Valmistatud segu lõppmahuks oli 20 µl.

Mikrosatelliitide fragmentanalüüs viidi läbi Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis kapillaarsekvenaatoriga ABI 3730xl DNA Analyzer.

3.4. Andmete analüüs

3.4.1 Morfoloogiliste andmete analüüs

Morfoloogiliste tunnuste üldised kirjeldavad statistikud (keskmine, miinimum, maksimum, standardhälve ja standardviga) leiti Statistica 13 programmi abil. Sama leiti ka tunnuste olulisus kasutades üldist lineaarmudeli analüüsi (GLM One-Way ANOVA).

Mõõdetud tunnuste statistiliste analüüside läbiviimiseks kasutati programmis R Studio pakette MorphoTools (Koutecký 2014), scatterplot3d (Ligges & Mächler 2003) ja ade4 (Dray & Dufour 2007). Eelnimetatud pakette kasutades viidi läbi morfoloogiliste tunnuste klasteranalüüs UPGMA (ehk kaalumata paaride) meetodil ning peakomponentanalüüs (PCA) nii populatsioonide kui indiviidide tunnuste põhjal kahemõõtmelisel teljestikul.

3.4.2. Geneetiliste andmete analüüs

Fragmentanalüüsil saadud tulemuste analüüsimiseks kasutati programmi Peak Scanner Software v2.0 ning suurusstandardit LIZ500 ja tuvastati amplifitseerunud DNA pikkused.

Geneetilise varieeruvuse iseloomustamiseks kasutati Microsoft Exceli põhise geneetilise analüüsi programmi GenAlEx (Genetic Analysis in Excel) 6.502 (Peakall & Smouse 2012). GenAlEx (Genetic Analysis in Excel) programmi kasutades leiti iga populatsiooni kohta peamisi geneetilise varieeruvuse näitajaid: keskmine alleelide arv lookuses (N_a), privaatsete alleelide arv (N_p), polümorfsete lookuste protsent (P), populatsioonide oodatud (H_e) ja vaadeldud (H_o) heterosügootsus ja fikseerumisindeks (F). GenAlEx lisandmooduli abil koostati populatsioonide vaheliste geneetiliste kauguste maatriks F_{st} väärtustega. Arvutati uuritud populatsioonide ja indiviidide geneetilise distantssi maatriks (GD) ning selle alusel koostati populatsioonide ja

indiviidide peakoordinaatanalüüsi graafikud (PCoA). AMOVA (Analysis of Molecular Variance) funktsiooni abil uuriti geneetilise varieeruvuse jaotumist populatsioonide vahel. Nei geneetilise distantse matriksi põhjal koostati programmiga Phylip 3.695 kaalumata paaride meetodil (UPGMA) dendrogramm, mille visualiseerimiseks kasutati programmi FigTree v1.4.2.

4. Tulemused

4.1 *Dactylorhiza russowii* ja *D. lapponica* morfoloogiliste tunnuste võrdlus

Dactylorhiza russowii ja *D. lapponica* morfoloogiliste tunnuste varieeruvuse uurimiseks analüüsiti 216 indiviidi 12 populatsioonist Põhja- ning Lõuna-Eestis ja Saaremaal ning leiti kõikide uuritud tunnuste kirjeldavad statistikud, välja arvatud *D. lapponica* õie pikkust ja laiust kirjeldavad väärtused Saaremaa populatsioonis, mida ei õnnestunud välitöödel mõõta. Morfoloogiliste tunnuste üldised kirjeldavad statistikud: keskmine (Mean), miinimum (Min), maksimum (Max), standardhälve (SD) on toodud tabelis 5.

Tabel 5. Russowi sõrmkäpa ja lapi sõrmkäpa morfoloogiliste tunnuste varieeruvust kirjeldavate statistikute võrdlus. Tabelis on toodud keskmine (mean), miinimum (min), maksimum (max), standardhälve (SD). Morfoloogiliste tunnuste lühendite tähendus on toodud tabelis 2.

Tunnus	<i>Dactylorhiza russowii</i>				<i>Dactylorhiza lapponica</i>			
	Mean	Min	Max	SD	Mean	Min	Max	SD
TaK (cm)	28,6	16	52	6,2	15,7	13	19	1,8
OkP (cm)	5,5	2,9	12	1,5	3,8	3	4,5	0,5
LeP (cm)	9,4	3,6	16,6	2,4	5,5	4,3	7,3	0,8
LeL (cm)	1,1	0,4	4	0,4	0,6	0,4	0,8	0,1
OiP (mm)	15,7	11,3	23,7	2,2	–	–	–	–
OiL (mm)	11,2	6,3	18,7	2,5	–	–	–	–
HuP (mm)	8,5	6,3	11,3	0,9	6,7	6	7,3	0,4
HuL (mm)	9,4	6,3	12,3	1,2	7,0	6,3	8	0,5
KaP (mm)	8,2	3,7	11,3	1,1	7,1	6,3	8	0,4
OiA (tk)	13	5	34	4,2	10	9	13	1,4
OkT (õit/cm)	3	1,3	4,9	0,3	2	2	3	0,6
LeA (tk)	2	1	4	0,6	2	2	3	0,5

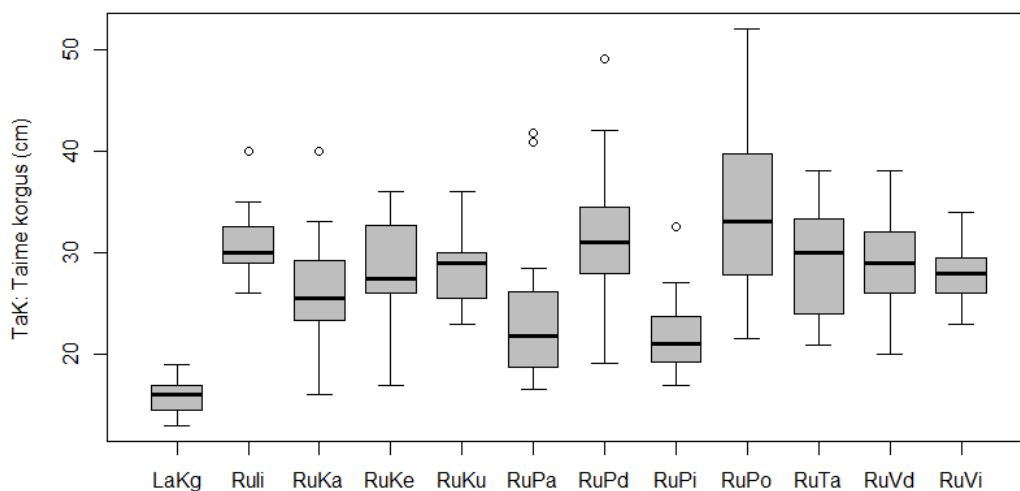
Morfoloogiliste tunnuste statistilise olulisuse selgitamiseks teostati variatsioonanalüüs (GLM One-Way ANOVA) kahe uuritud taksoni vahel ning tulemuseks leiti statistiliselt olulised erinevused üheteistkümmne tunnuse puhul ($p < 0,05$). Tabelis 6 on toodud ANOVA analüüsiga arvutatud F ja p väärtused. Mida suurem on F statistiku väärtus, seda olulisem on liikide eristumine.

Tabel 6. Morfoloogilised tunnused ning neile vastavad F (sulgudes on vabadusastmed) ja p statistikute väärtused. Olulisuse nivooks kasutati $p < 0,05$.

Tunnus	F (1,214)	p
Taime kõrgus	63,8	$p < 0,00001$
Huule laius	63,7	$p < 0,00001$
Huule pikkus	63,4	$p < 0,00001$
Lehe pikkus	39,1	$p < 0,00001$
Lehe laius	21,2	$p = 0,00001$
Õie laius	22,8	$p < 0,00001$
Õie pikkus	20,3	$p = 0,00001$
Õisiku pikkus	19,3	$p = 0,00002$
Kannuse pikkus	18,2	$p = 0,00003$
Õite arv	6,8	$p = 0,01$
Õisiku tihedus	4,4	$p = 0,04$
Lehtede arv	0,2	$p = 0,7$

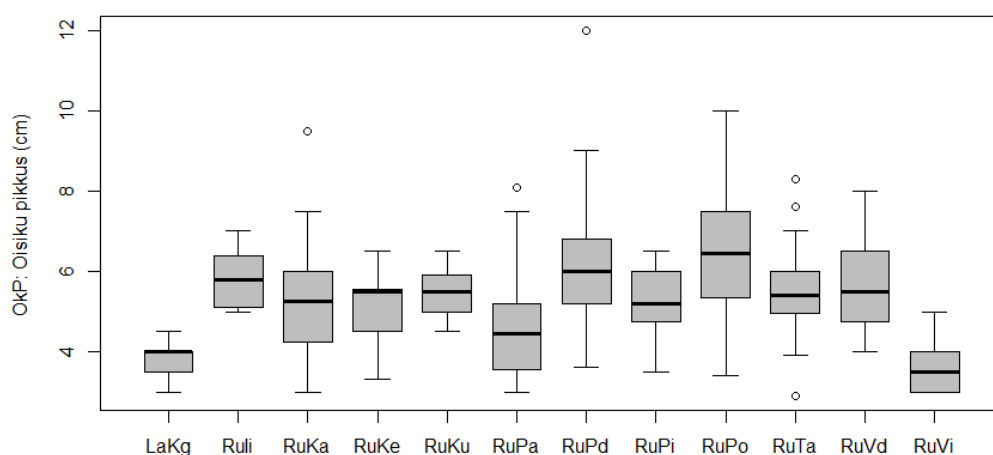
Statistiliselt olulist erinevust morfoloogiliste tunnuste vahel leiti järgmistes tunnustes: taime kõrguses ($p < 0,00001$), huule pikkuses ($p < 0,00001$), huule laiuses ($p < 0,00001$), lehe pikkuses ($p < 0,00001$), õie laiuses ($p < 0,00001$), lehe laiuses ($p = 0,00001$), õisiku pikkuses ($p = 0,00002$), õie pikkuses ($p = 0,00001$), kannuse pikkuses ($p = 0,00003$), õite arvus ($p = 0,01$) ja õisiku tiheduses ($p = 0,04$) (Tabel 6). Lehtede arvus kahe taksoni vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

Uuritavate populatsioonide taime kõrguste keskmised väärtused on näidatud joonisel 2. Keskmiselt kõrgemad taimed kasvavad Lõuna-Eestis – $33,6 \pm 7,9$ cm Põlva (RuPo) populatsioonis. Madalamad taimed on $22,4 \pm 4,5$ cm Pikavere (RuPi) populatsioonis. *Dactylorhiza lapponica* taimed Kugalepa 1 populatsioonist (LaKg) on kõige madalamad $15,7 \pm 1,8$ cm (Joonis 2).



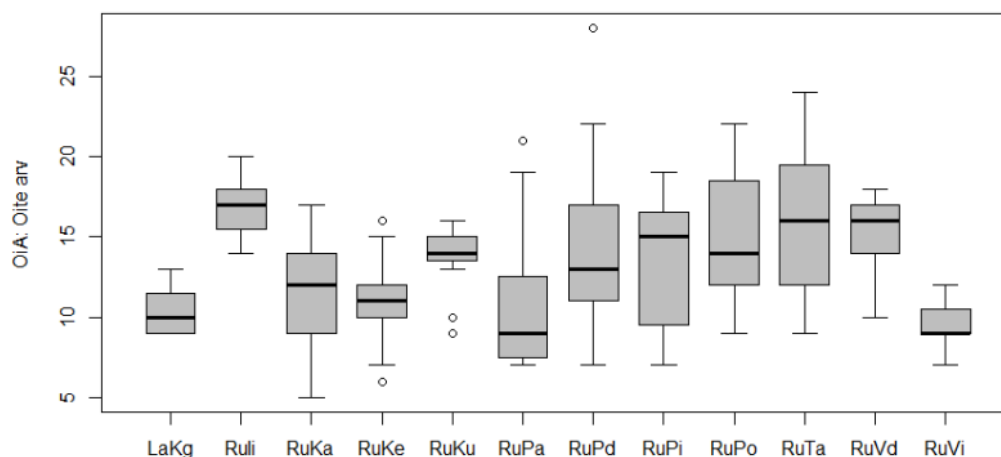
Joonis 2. Taime kõrguse varieeruvus populatsioonide vahel. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1. Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

Õisiku pikkuste varieeruvus populatsioonide vahel näitas, et kõrgematel taimedel populatsioonides Iide (RuIi) ja Põlva (RuPo) on ka suuremad õisikud (Joonis 3). Iide (RuIi) populatsioonis on õisikud $5,8 \pm 0,7$ cm ja Põlva (RuPo) populatsioonis $6,4 \pm 1,6$ cm. *Dactylorhiza lapponica* taimedel Kugalepa 1 (LaKg) populatsioonis on õisiku pikkus $3,8 \pm 0,1$ cm (Tabel 3, Joonis 3), millest väiksem on ainult Viieristi (RuVi) populatsioonis olevatel taimedel, sealsete õisikute pikkus on $3,5 \pm 0,6$ cm.



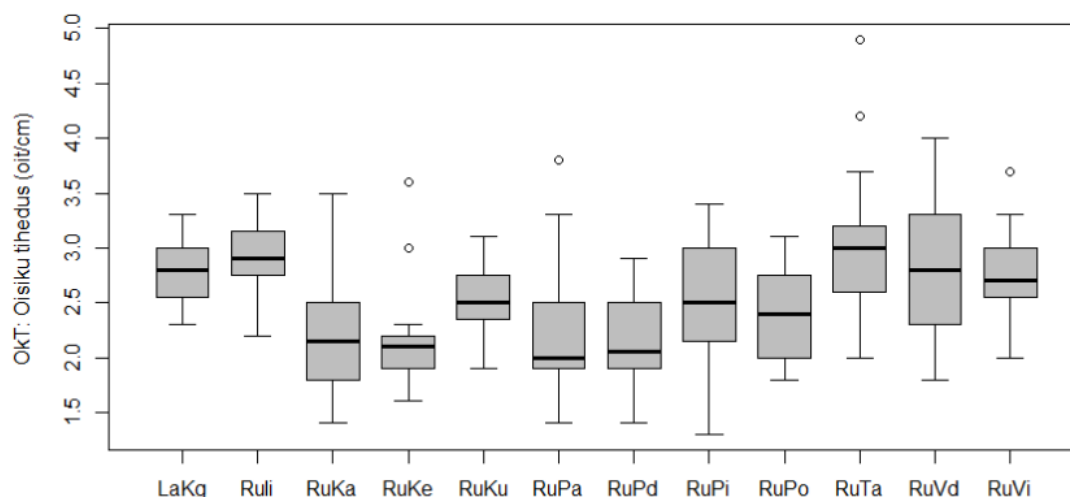
Joonis 3. Õisiku pikkuse varieeruvus populatsioonide vahel. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1. Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

Õite arv õisikus oli seotud õisiku pikkusega ning kõige rohkem õisi oli oodatult populatsioonides Iide (RuIi) $17 \pm 1,9$ ja Tatra (RuTa) $16 \pm 5,6$ õit. Põhja-Eesti populatsioonides on keskmiselt vähem õisi Pikavere (RuPi) $13 \pm 4,3$, Kaasiku (RuKa) $12 \pm 3,3$ õit, Keila (RuKe) $11 \pm 2,5$ õit ja Palivere (RuPa) populatsioonis $11 \pm 4,2$ õit. Kõige väiksema õisikuga taimedel Viieristi (ViR) populatsioonis on õisi $10 \pm 1,4$ (Joonis 4).



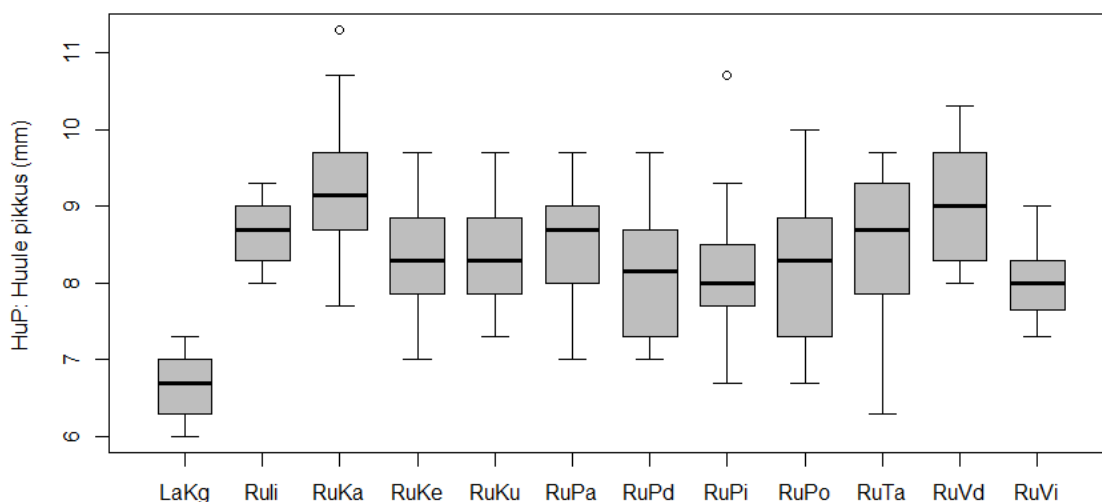
Joonis 4. Õite arvu varieeruvus populatsioonide vahel. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1. Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

Õisiku tihedus erines samuti populatsioonide vahel (joonis 5). Saaremaa populatsioonides õisiku tihedus oli suhteliselt ühesugune. Iide (RuIi) populatsioonis on $2,9 \pm 0$ õit/cm, Viieristi (RuVi) $2,8 \pm 0$ õit/cm ja Viidu (RuVd) populatsioonis $2,8 \pm 1$ õit/cm. *Dactylorhiza lapponica* tüüpi taimedel populatsioonist Kugalepa 1 (LaKg) õisiku tihedus oli väga sarnane ehk $2,8 \pm 0,3$ õit/cm-le. Lõuna-Eesti populatsioonidest on kõige tihedamad õisikud Tattras (RuTa) $3,0 \pm 1,0$ õit/cm. Põhja-Eesti populatsioonides (RuKa, RuKe, RuPa ja RuPi) võrreldes teiste leiukohtadega on õisikud hõredamad, nendest veidi tihedamate õisikutega ($2,5 \pm 1,0$ õit/cm) taimed on Pikavere (RuPi) populatsioonis.



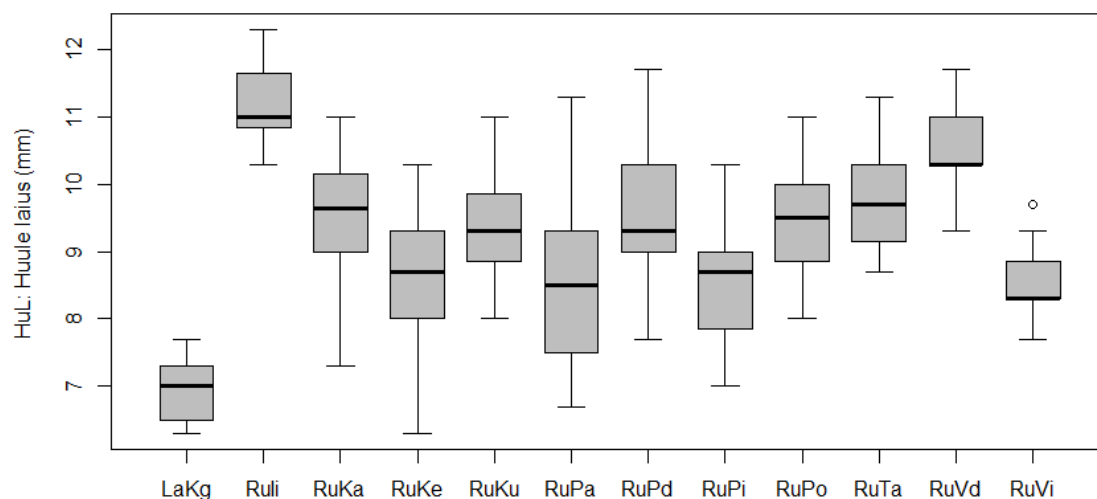
Joonis 5. Õisiku tiheduse varieeruvus populatsioonide vahel. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1. Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

Üks olulisematest tunnustest on huule pikkuste erinevus populatsioonide vahel (joonis 6). Saaremaa populatsioonidest pikemate huultega taimed $9,04 \pm 0,72$ mm on Viidu (RuVd) populatsioonis ning kõige lühemate huultega $8,05 \pm 0,58$ mm taimed Viieristi (RuVi) populatsioonis. Põhja-Eesti populatsioonidest eristub eriti pikkade huultega taimed Kaasiku (RuKa) populatsioonis $9,35 \pm 0,93$ mm, mis on ühtlasi ka üle kõikide populatsioonide suurim väärtus. Lõuna-Eesti populatsioonidest on Tatra (RuTa) pikemad huuled $8,5 \pm 0,9$ mm. Kõige lühemate huultega taimed $6,7 \pm 0,4$ mm on Kugalepa 1 (LaKg) populatsioonis (Joonis 6).



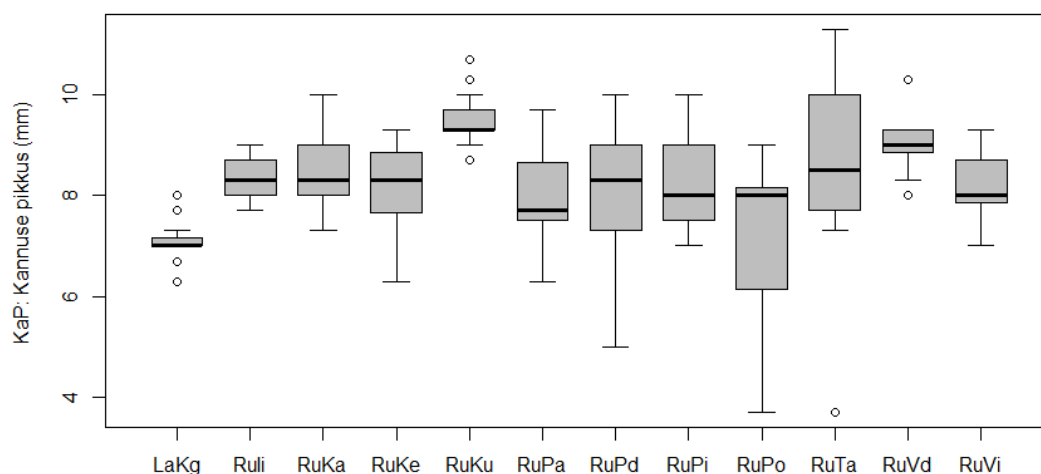
Joonis 6. Huule pikkuse varieeruvus populatsioonide vahel. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1. Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

Üks olulisematest tunnustest on huule laius, mille varieeruvus populatsioonide vahel on näidatud joonisel 7. Põhja-Eestis on laiema huulega $9,5 \pm 1,0$ mm Kaasiku (KaR) populatsiooni taimed ja kitsama huulega Palivere (RuPa) $8,5 \pm 1,3$ mm ja Pikavere (RuPi) $8,5 \pm 1,0$ mm populatsioonides. Lõuna-Eestis laiemate huultega taimed on Tatra (RuTa) populatsioonis $9,8 \pm 0,8$ mm ja kitsamate huultega taimed Põlva (RuPo) populatsioonis $9,4 \pm 0,8$ mm. Kugalepa (LaKg) populatsiooni taimed on teistest kõige kitsama huulega $7,0 \pm 0,5$ mm (Joonis 7).



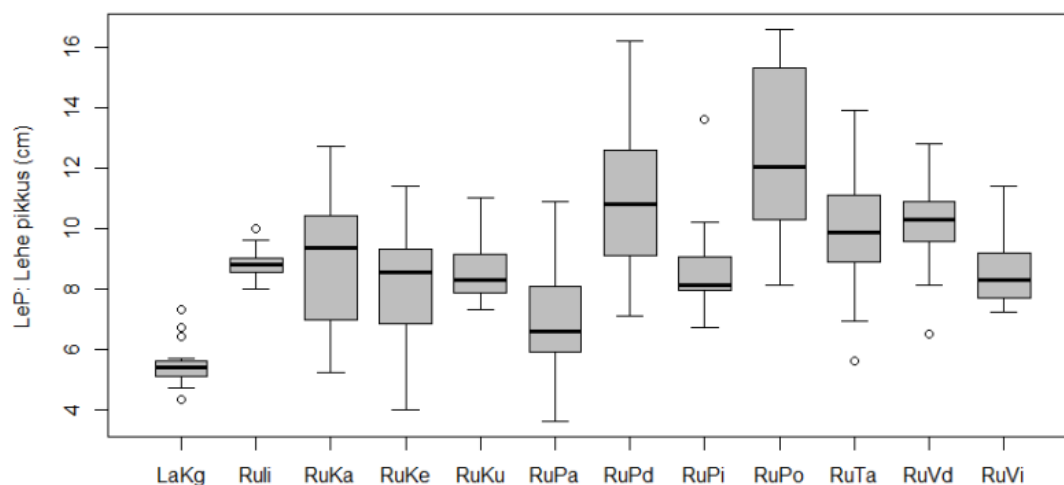
Joonis 7. Huule laiuse varieeruvus populatsioonide vahel. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1. Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

Õie südamikust välja kasvavate kannuste pikkused varieeruvad kõige lühikesest Põlva (RuPo) populatsioonis ($7,3 \pm 1,5$ mm) kuni kõige pikema kannuseni ($9,5 \pm 0,5$ mm) Kugalepa (RuKu) populatsioonis Saaremaal (Joonis 8). Veidi lühemad kannused taimedel Viidu (RuVd) populatsioonis ($9,1 \pm 0,6$ mm). Põhja-Eesti taimedel pikemad kannused on taimedel Kaasiku (RuKa) populatsioonis ($8,5 \pm 0,8$) ja Lõuna-Eesti taimedest kõige pikemad kannused $8,7 \pm 1,7$ mm on Tatra (RuTa) populatsioonis. Kõige lühemate kannustega taimed on $7,1 \pm 0,4$ mm Kugalepa (LaKg) populatsioonis.



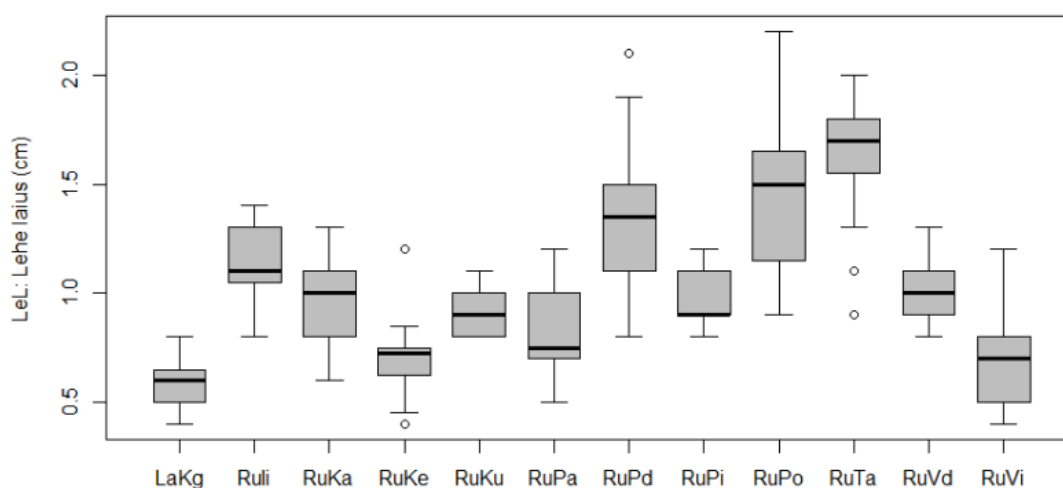
Joonis 8. Kannuse pikkuse varieeruvus populatsioonide vahel. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1. Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

Lehe pikkuse varieeruvust näitav joonis 9 illustreerib, et kõige pikemate lehtedega taimed on Lõuna-Eesti populatsioonides. Lõuna-Eestis pikemad lehed $12,6 \pm 2,6$ cm on Põlva (RuPo) populatsioonis ning lühemad on Tatra (TaR) populatsioonis $9,8 \pm 2,0$ cm. Kugalepa (LaKg) taimede lehe pikkus on $5,5 \pm 0,8$ cm.



Joonis 9. Lehe pikkuse varieeruvus populatsioonide vahel. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1. Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

Populatsioonide lehe laiuse varieeruvuse jooniselt on näha, et Lõuna-Eesti pikkadel lehtedel on ka teistest populatsioonidest suurim laius (Joonis 10). Kõige laiemad $1,6 \pm 0,3$ cm lehed on Tatra (RuTa) populatsioonis ning teistes on see väärtus peaaegu võrdne, Põlva (RuPo) populatsiooni taimedel on $1,4 \pm 0,3$ cm ja Päidlapalu (RuPd) populatsiooni taimedel $1,4 \pm 0,6$ cm. Põhja-Eesti ja Saaremaa populatsiooni taimede lehed on võrreldes Lõuna-Eesti taimede lehtedega kitsamad. Kõige kitsamate lehtedega on Kugalepa (LaKg) populatsioon, mille lehe laius võrdub $0,6 \pm 0,1$ cm.



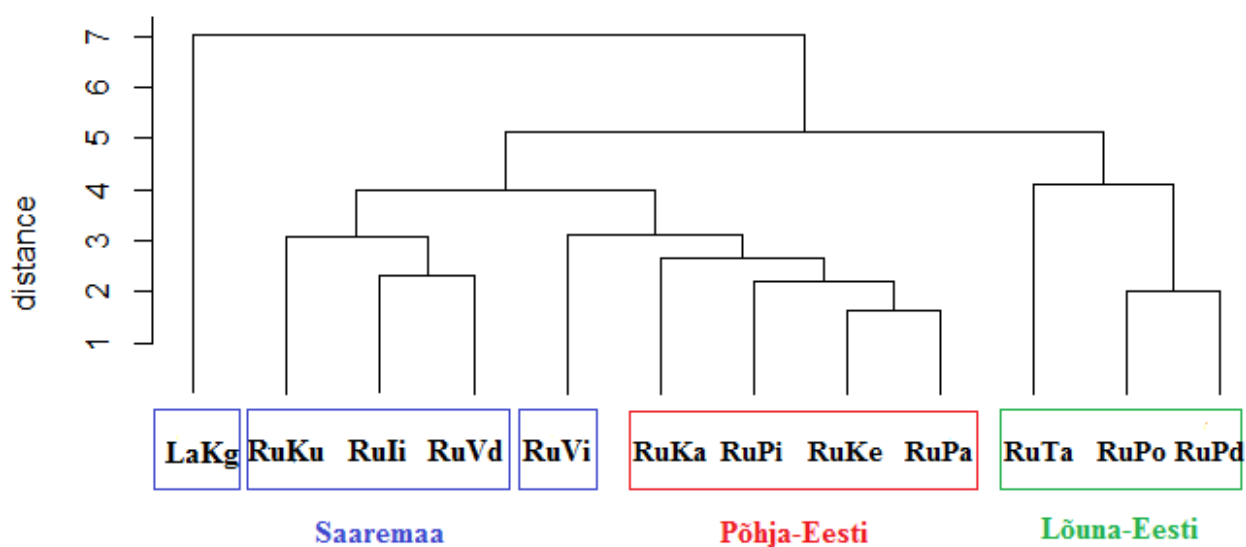
Joonis 10. Lehe laiuse varieeruvus populatsioonide vahel. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1. Karpdiagrammid kirjeldavad väärtuste jaotumist järgmiselt: miinimum, 5%, 25% (alumine kvantiil), 50% (mediaan), 75% (ülemine kvantiil), 95% ja maksimum.

Tabelis 7 on toodud uuritud populatsioonide morfoloogiliste tunnuste võrdlus geograafilise asukoha järgi. Keskmiselt kõige kõrgemad taimed on Lõuna-Eestis $31,4 \pm 6,5$ cm ja madalamad on Põhja-Eestis $25,4 \pm 6,0$ cm. Lõuna-Eesti taimedel on ka pikemad õisikud $6,1 \pm 1,6$ cm. Taimede õisiku pikkus Põhja-Eestis on $5,1 \pm 1,4$ cm ja Saaremaal $5,1 \pm 1,2$ cm. Lõuna-Eesti taimed eristuvad teistest ka pikemate ($11,1 \pm 2,5$ cm) ja laiemate ($1,5 \pm 0,4$ cm) lehtedega.

Tabel 7. Russowi sõrmkäpa morfoloogiliste tunnuste keskmine koos standardhälbega (Mean±SD) võrdlus uuritud populatsioonide geograafilise asukoha järgi (Põhja-Eesti, Lõuna-Eesti ja Saaremaa).

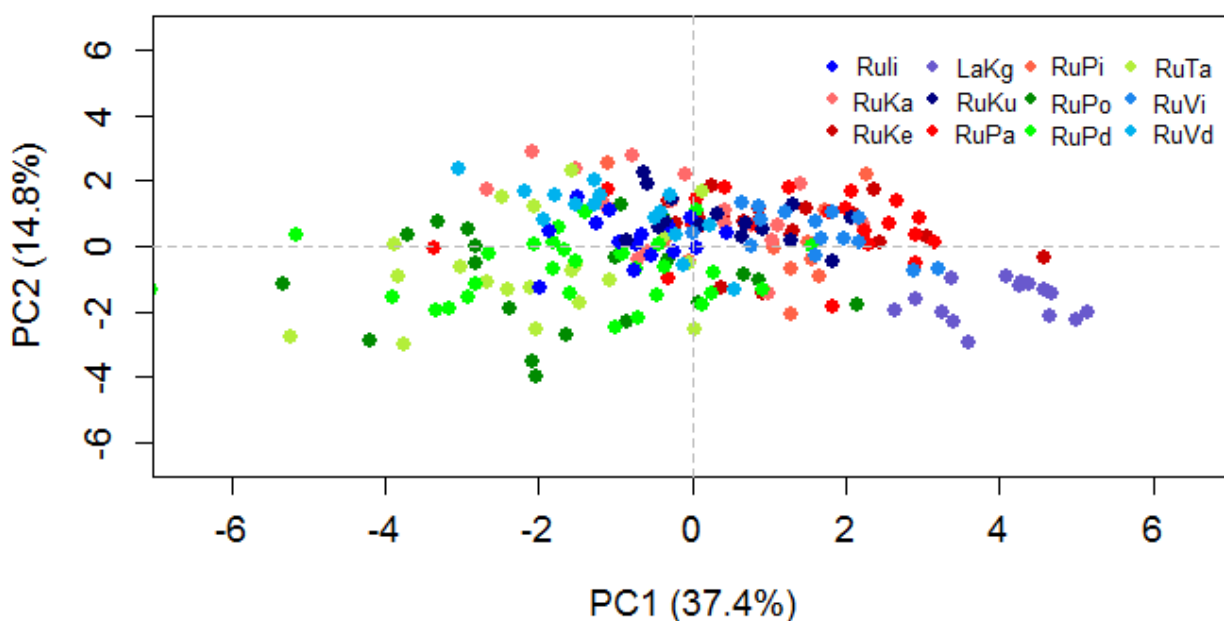
	Põhja-Eesti	Lõuna-Eesti	Saaremaa
Taime kõrgus (cm)	25,4±6,0	31,4±6,5	29,1±4,0
Õisiku pikkus (cm)	5,1±1,4	6,1±1,6	5,1±1,2
Õite arv (tk)	11,4±3,6	14,9±4,8	13,9±3,3
Õisiku tihedus (õit/cm)	2±0,6	3±0,6	3±0,5
Õie pikkus (mm)	15±1,7	16±2,3	–
Õie laius (mm)	10,2±1,9	12,4±2,5	–
Huule pikkus (mm)	8,7±0,9	8,3±0,9	8,5±0,7
Huule laius (mm)	8,8±1,1	9,6±0,9	10,0±1,2
Kannuse pikkus (mm)	8,2±0,9	8,0±1,5	8,8±0,8
Lehtede arv (tk)	2±0,4	3±0,6	2±0,3
Lehe pikkus(cm)	8,1±2,1	11,1±2,5	9,0±1,3
Lehe laius (cm)	0,9±0,2	1,5±0,4	0,9±0,2

Morfoloogiliste tunnuste klasteranalüüs UPGMA (joonis 11) näitab populatsioonide jaotumist geograafilise asukoha järgi. Kõik uuritud populatsioonid, v.a. Kugalepa 1 (LaKg) populatsioon moodustavad suure rühma, mis oma korda jaguneb kahte gruppi. Lõuna-Eesti populatsioonid (RuTa, RuPo ja RuPd) klasterduvad selgelt eraldi. Põhja-Eesti ja Saaremaa populatsioonid on koondunud teise gruppi, milles omakorda on kaks alamgruppi. Ühes alamgrupis on kõik Põhja-Eesti populatsioonid (RuPa, RuKe, RuPi ja RuKa) ning üks Saaremaa populatsioon (RuVi). Teises alamgrupis on enamik populatsioone Saaremaalt (RuKu, RuLi ja RuVd).



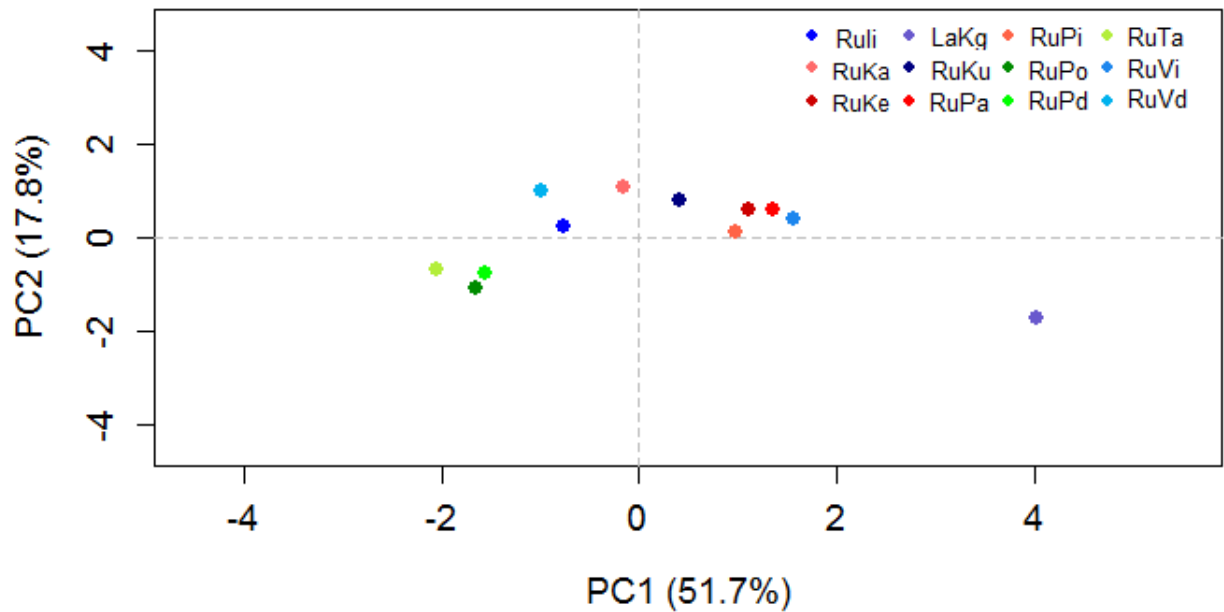
Joonis 11. Uuritud liikide populatsioonide UPGMA dendrogramm morfoloogiliste tunnuste põhjal. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1.

Joonisel 12 on kujutatud indiviidide PCA tulemusi kahemõõtmelisel teljestikul, kus peakomponent 1 (37,4%) ja 2 (14,8%) kirjeldavad kokku 52,2% kogu indiviididevahelisest morfoloogilisest varieeruvusest. Indiviidide PCA tulemusi kujutaval joonisel selgub, et Lõuna-Eesti populatsioonid morfoloogiliste tunnuste põhjal selgelt eristunud teistest uuritud populatsioonidest. Võib märgata, et Põhja-Eesti populatsioonid (RuKa, RuKe, RuPa ja RuPi) hoiduvad üksteisele lähestikku, mis on kooskõlas kaalumata paaride meetodil läbi viidud klasteranalüüsiga. Saaremaa populatsiooni Kugalepa (LaKg) kuuluvad lapi sõrmkäpa individid, mis moodustavad omaette grupi.



Joonis 12. Uuritud liikide indiviidide PCA morfoloogiliste tunnuste põhjal. Punaste värvidega on tähistatud Põhja-Eesti populatsioone, roheliste värvidega Lõuna-Eesti populatsioone ja Saaremaa populatsioone siniste värvidega. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1.

Joonisel 13 on kujutatud uuritud populatsioonide PCA tulemusi kahemõõtmelisel teljestikul, kus peakomponent 1 (51,7%) ja peakomponent 2 (17,8%) kirjeldavad kokku 69,5% kogu populatsioonidevahelisest morfoloogilisest varieeruvusest. Uuritud populatsioonide PCA tulemus sarnaneb UPGMA dendrogrammiga. Kolm Põhja-Eesti populatsiooni (RuKe, RuPa ja RuPi) ja üks Saaremaa (RuVi) populatsioon asuvad väga lähestikku, mis vastab ühele alamgrupile klasteranalüüsis. Samuti Lõuna-Eesti populatsioonid hoiduvad teistest populatsioonidest eraldi ning klasteranalüüsis nimetatud populatsioonid klasterdusid samuti selgelt eraldi. *Dactylorhiza lapponica* Kugalepa populatsioonist (LaKg) on mõlema analüüsi puhul teistest eraldiseisev.



Joonis 13. Uuritud liikide populatsioonide PCA morfoloogiliste tunnuste põhjal. Punaste värvidega on tähistatud Põhja-Eesti populatsioone, roheliste värvidega Lõuna-Eesti populatsioone ja Saaremaa populatsioone siniste värvidega. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1.

Võrkdiagrammil (joonis 14) on kujutatud indiviidide PCA tulemust. Populatsiooni keskmine väärtus, mis on tähistatud populatsiooni lühendiga, ühendatakse joonega iga indiviidi kujutava punktiga. Joone pikkus näitab indiviidi erinevust keskmisest väärtusest. Lõuna-Eesti populatsioonid ja Saaremaa Kugalepa 1 (LaKg) ehk *D. lapponica* eristuvad ülejäänud populatsioonidest. Põhja-Eesti (RuKe, RuPa ja RuPi) ja üks Saaremaa populatsioon (RuVi) koonduvad ühte rühma.

4.2 Analüüsitud taksonite geneetiline varieeruvus

4.2.1 Mikrosatelliitide varieeruvus

Mikrosatelliitanalüüsil uuriti 321 indiviidi 19 populatsioonist Eestist, Karjalast ning Austriast. Kokku analüüsiti 181 *D. russowii* indiviidi, 9 hübriidi *D. russowii x incarnata*, 1 hübriid *D. russowii x baltica*, 2 hübriidi *D. russowii x maculata*, 16 *D. lapponica* indiviidi, 30 *D. traunsteineri* indiviidi ning võrdlusmaterjalina kaasati ka 16 *D. praetermissa* indiviidi, 35 *D. baltica var. kuzkenembe* indiviidi, 20 *D. maculata* indiviidi ja 11 *D. fuchsii* indiviidi.

Mikrosatelliitanalüüsil uuritud nelja tuuma lookuse lõikes kõigi taksonite uuritud indiviidide arv (N), polümorfsete lookuste osakaal protsentides (P), keskmine alleelide arv lookuses (Na), privaatsete alleelide arv (Np), vaadeldud (Ho) ja oodatav heterosügootsus (He) ning fikseerumisindeks (F) on toodud tabelis 8.

Tabel 8. Uuritud liikide indiviidide arv (N), polümorfsete lookuste osakaal protsentides (P), keskmine alleelide arv lookuses (Na), privaatsete alleelide arv (Np), vaadeldud heterosügootsus (Ho), oodatav heterosügootsus (He) ning fikseerumiskoeffitsient (F).

Takson	N	P	Na	Np	Ho	He	F
<i>D. russowii</i>	178	100	15,25	6,25	0,251	0,672	0,644
<i>D. lapponica</i>	16	75	5,25	0,25	0,250	0,545	0,513
<i>D. traunsteineri</i>	29	75	4,75	0,50	0,106	0,476	0,786
<i>D. praetermissa</i>	16	100	4,50	0	0,109	0,510	0,831
<i>D. baltica var. kuzkenembe</i>	32	100	8,25	2,25	0,293	0,690	0,524
<i>D. maculata</i>	20	100	4,5	0,25	0,352	0,598	0,423
<i>D. fuchsii</i>	11	100	4,5	0,25	0,307	0,659	0,544

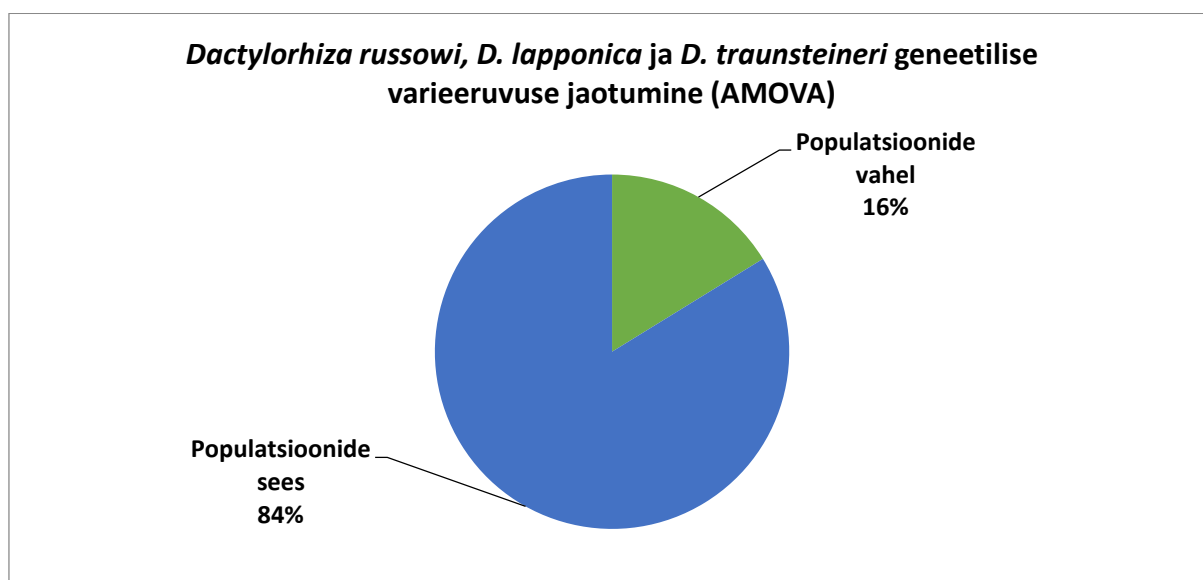
Kõige suurem geneetiline varieeruvus on taksonil *D. russowii*, mille keskmine alleelide arv Na = 15,25. *D. lapponica* geneetiline varieeruvus (Na = 5,25) on veidi suurem kui *D. traunsteineri* oma (Na = 4,75). Privaatsete alleelide arv (Np = 6,25) on samuti suurim *D. russowii* puhul, *D. lapponica* (Np = 0,25) on kaks korda madalam kui *D. traunsteineri* (Np = 0,50) oma. Inbriidingukoeffitsient on positiivne ning kolme lähedase liigi puhul varieerub 0,51 kuni 0,79 (tabel 8).

Samuti leiti uuritud taksonite populatsioonide geneetilise varieeruvuse iseloomustavad näitajad, mis on toodud lisa 3. *Dactylorhiza russowii* populatsioonidest on geneetiliselt kõige varieeruvamad Palivere (RuPa) populatsioon, mille keskmine alleelide arv Na = 4,5 ja privaatsete alleelide arv Np = 0,75 ning Põlva (RuPo) populatsioon, mille keskmine alleelide arv Na = 6,5 ja privaatsete alleelide arv on kõige suurim ja võrdub Np = 1,5 (lisa 3).

Dactylorhiza russowii, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri* populatsioonide ja indiviidide vahelise geneetilise varieeruvuse jaotumise selgitamiseks viidi läbi hierarhiline AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) analüüs. AMOVA tulemus näitas, et populatsioonisisene varieeruvus on suurem (84%) kui populatsioonide vahel (16%) (joonis 15, tabel 9).

Tabel 9. Hierarhiline AMOVA analüüs. Tabelis on toodud df – vabadusastmete arv, SS – ruutude summa, MS – SS/df, % - varieeruvuse määr, p – statistiline olulisus.

Varieeruvuse tase	df	SS	MS	%	p
Populatsioonide vahel	2	41,652	20,826	16%	0,001
Populatsioonide sees	451	586,201	1,300	84%	0,001
Kokku	453	627,852		100%	



Joonis 15. *Dactylorhiza russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri* geneetilise varieeruvuse jaotuse hierarhilise AMOVA analüüsi tulemus.

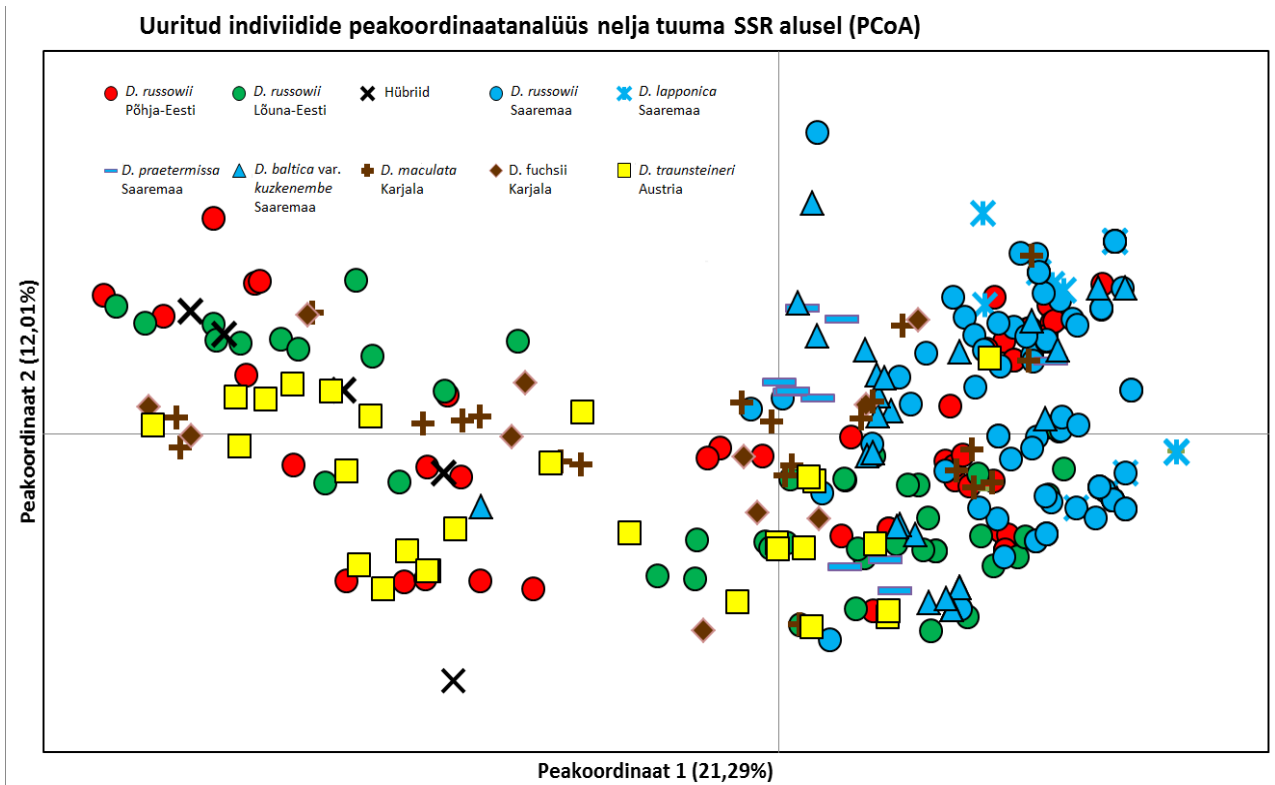
Kolme lähedase liigi geneetilise eristumise leidmiseks lisandmooduli GenAlEx abil arvutati liikidevahelised eristumise väärtused (F_{st}), mis on toodud tabelis 10. *D. lapponica* ja *D. traunsteineri* vaheline eristumine ($F_{st} = 0,175$) on suurem, kui *D. russowii* ja *D. traunsteineri* vahel ($F_{st} = 0,134$). Kõige vähem eristuvad omavahel *D. russowii* ja *D. lapponica* ($F_{st} = 0,035$).

Tabel 10. *Dactylorhiza russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri* geneetilise eristumise Fst väärtused tuuma SSR andemete alusel.

<i>Dactylorhiza russowii</i>	<i>Dactylorhiza lapponica</i>	<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	
0			<i>Dactylorhiza russowii</i>
0,035	0		<i>Dactylorhiza lapponica</i>
0,134	0,175	0	<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>

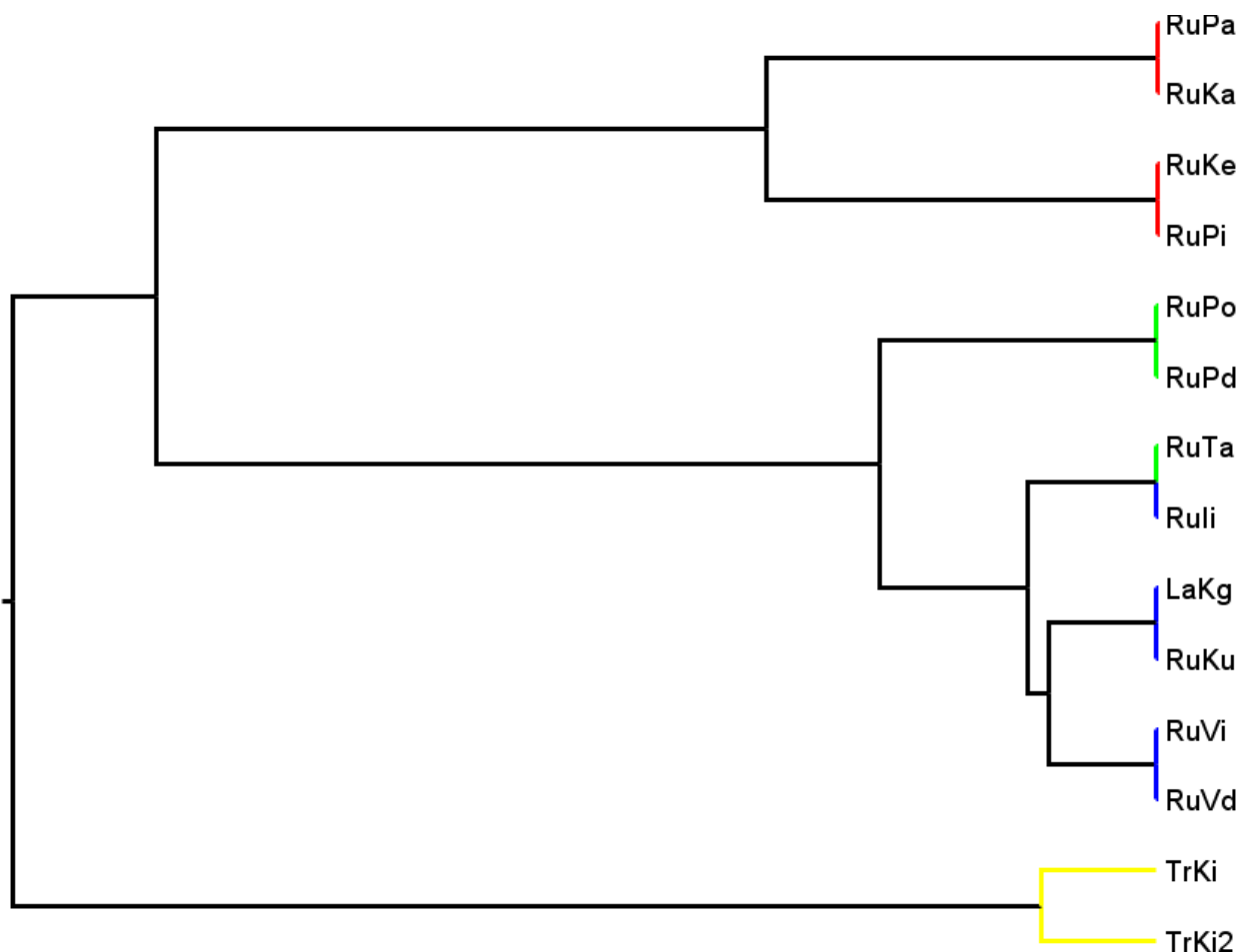
Samuti võrreldi kõigi uuritud liikide populatsioonide geneetilist eristumist (lisa 4). Paarikaupa eristumise (Fst) maatriksi põhjal selgub, et kõige rohkem eristuvad omavahel *D. russowii* Palivere populatsioon (RuPa) ja *D. lapponica* Kugalepa 1 (LaKg) Fst = 0,438, samuti suure Fst väärtusega (Fst = 0,369) on *D. russowii* Põlva (RuPo) populatsiooni ja *D. lapponica* Kugalepa 1 (LaKg) populatsioonide geneetiline eristumine. Kõige vähem eristuvad omavahel *D. russowii* populatsioonid Viieristi (RuVi) ja Viidu (RuVd), Fst = 0,034. *D. traunsteineri* kahe populatsiooni omavaheline geneetiline eristumine on kõige väiksem, Fst = 0,027 (lisa 4). Kõige madalam Fst väärtus on Fst = 0,027, mis näitab

Peakoordinaatanalüüsi (PCoA) läbi viimiseks võeti aluseks nii populatsioonide kui ka indiviidide Nei geneetilise distantse väärtused. Joonis 16 kujutab populatsioonide PCoA tulemusi kahe koordinaatvektori põhjal, milles peakoordinaat 1 (47,27%) ja peakoordinaat 2 (17,5%) kirjeldavad kokku 64,77% kogu populatsioonide vahelisest varieeruvusest. Uuritud populatsioonid jaotusid kahte rühma. Väiksemasse rühma grupeeruvad Põhja-Eesti Palivere populatsioon (RuPa) ja Lõuna-Eesti Põlva populatsioon (RuPo), kus lisaks puhtale *D. russowii* indiviidide tuvastati hübriide balti (RxBPo) ja kahkjaspunase sõrmkäpaga (RxIPo). Suurema rühma moodustavad Põhja-Eesti populatsioonid koos Saaremaa populatsioonidega. Nendega koos asub üks Lõuna-Eesti populatsioon (RuTa). Samasse rühma kulub ka *D. lapponica* populatsioon (LaKg). Karjala *D. maculata* ja *D. fuchsii* populatsioonid on veidi eristunud. Austria *D. traunsteineri* populatsioonid on lähedased Karjala *D. fuchsii* populatsiooniga. Hübriidsed populatsioonid asuvad hajusalt.



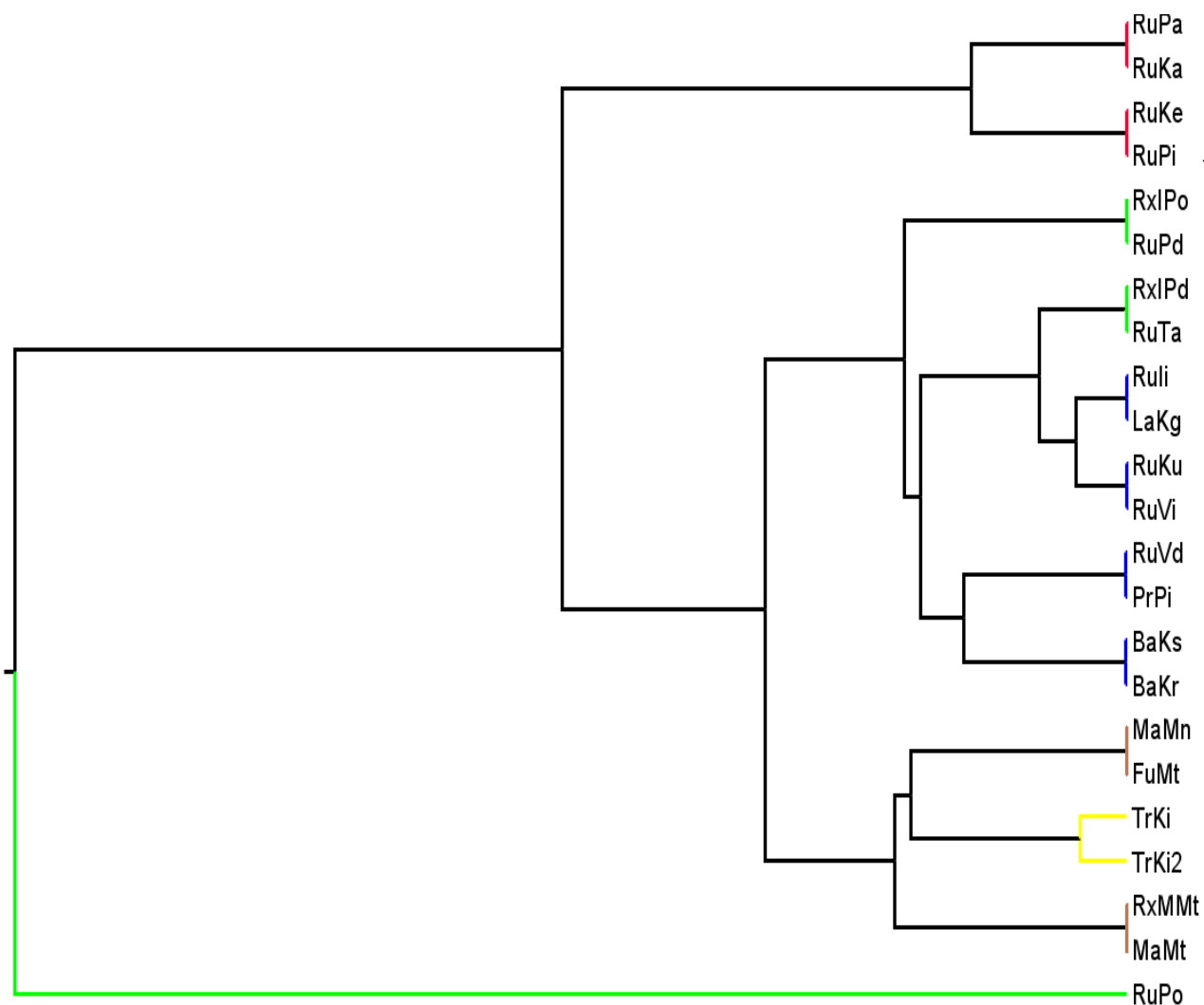
Joonis 17. Uuritud taksonite indiviidide peakoordinaatanalüüs (PcoA) tuuma SSR andmete alusel. Erinevate sümbolitega tähistatud populatsioonide taksonoomiline kuuluvus: ● – *D. russowii*, ■ – *D. traunsteineri*, ж – *D. lapponica*, — – *D. praetermisssa*, ▲ – *D. baltica* var. *kuzkenembe*, ◆ – *D. fuchsii*, + – *D. maculata*, ✕ – hübriidid. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud taksonite geograafiline paiknevus: Põhja-Eesti on punase värviga, Lõuna-Eesti on rohelise, Saaremaa on sinise värviga, Austria on kollase värviga, Karjala on pruuni värviga, hübriidid on musta värviga.

Et võrrelda kolme lähedase liigi (*D. russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) klasterdumist koostati Nei geneetiliste distantside abil UPGMA dendrogramm, mis on näidatud joonisel 18. Dendrogrammilt näeb, et uuritud liigid jaotusid kolme klastrisse: *D. traunsteineri* moodustas eraldi sõsarrühma, ülejäänud populatsioonid moodustasid suurema klatri, mis jagunes kaheks alamrühmaks. Üks alamrühm koosnes ainult Põhja-Eesti *D. russowii* populatsioonidest. Teine alamrühm jagunes omakorda kaheks: ühes on kaks Lõuna-Eesti *D. russowii* populatsiooni koos, teises on Saaremaa *D. russowii* ja *D. lapponica* populatsioonid koos ühe Lõuna-Eesti populatsiooniga (RuTa).



Joonis 18. Kolme lähedase liigi (*Dactylorhiza russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) UPGMA dendrogramm tuuma SSR alusel. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud liikide geograafiline paiknevus: Põhja-Eesti on punase värviga, Lõuna-Eesti on rohelise värviga, Saaremaa on sinise värviga, Austria on kollase värviga. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1.

Samuti koostati UPGMA dendrogramm kõikide uuritud taksonite populatsioonide kohta (joonis 19). Sellel dendrogrammil võib näha samuti teatud geograafilised rühmad: Põhja-Eesti, Lõuna-Eesti, Austria, Karjala ning Saaremaa. Austria *D. traunsteineri*, Karjala *D. maculata*, *D. fuchsii* ning hübriidne populatsioon moodustavad ühe klasteri. Liigid omavahel selgelt ei eristunud.



Joonis 19. Kõigi uuritud taksonite UPGMA dendrogramm tuuma SSR andmetel. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud liikide geograafiline paiknevus: Põhja-Eesti on punase värviga, Lõuna-Eesti on rohelise, Saaremaa on sinise värviga, Austria on kollase värviga ning Karjala pruuni värviga. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1.

4.2.2 Plastiidide ja ITS alleelide varieeruvus

Kloroplastide ja ITS andmed, kui emasvanema poolt päritavad markerid, mis näitavad haplotüüpide varieeruvust, olid analüüsitud eraldi.

Uuritud kuue plastiidi SSR andmete alusel leiti uuritud liikide geneetilise varieeruvuse näitajad, mis on toodud tabelis 11. Selgub, et *D. ruscowii* on geneetiliselt varieeruvam ($N_a = 9$), kui *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*, mille keskmine alleelide arv $N_a = 4$ (tabel 10). Kõigi uuritud liikide fikseerumisindeksid on kõrged ning kolme lähedase liigi (*D. ruscowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) fikseerumisindeks varieerub 0,813 kuni 0,894.

Tabel 11. Uuritud liikide indiviidide arv (N), polümorfsete lookuste osakaal protsentides (P), keskmine alleelide arv lookuses (Na), privaatsete alleelide arv (Np), vaadeldud heterosügootsus (Ho), oodatav heterosügootsus (He) ning fikseerumiskoeffitsient (F).

Liik	N	P	Na	Ho	He	F
<i>D. russowii</i>	176	100	9	0,120	0,588	0,813
<i>D. lapponica</i>	16	83,3	4	0,063	0,523	0,894
<i>D. traunsteineri</i>	30	83,3	4	0,089	0,429	0,825
<i>D. praetermisssa</i>	16	100	4,5	0,156	0,520	0,764
<i>D. baltica var. kuzkenembe</i>	35	100	7	0,072	0,618	0,902
<i>D. maculata</i>	20	100	5,3	0,108	0,596	0,825
<i>D. fuchsii</i>	11	83,3	2,5	0,045	0,294	0,824

Kõigi uuritud taksonite populatsioonide geneetilise varieeruvuse näitajad on toodud lisa 5. *Dactylorhiza russowii* populatsioonidest on keskmiselt kõige suurema varieeruvusega (Na = 3,8) Viidu (RuVd) populatsioon Saaremaalt. Samas populatsioonis on ka kõrgeim fikseerumisindeks (F = 0,9). Suurim polümorfsete lookuste osakaal ehk 100% on kolmel populatsioonil: Põlva (RuPo), Tatra (RuTa) ja Viieristi (RuVi) (lisa 5).

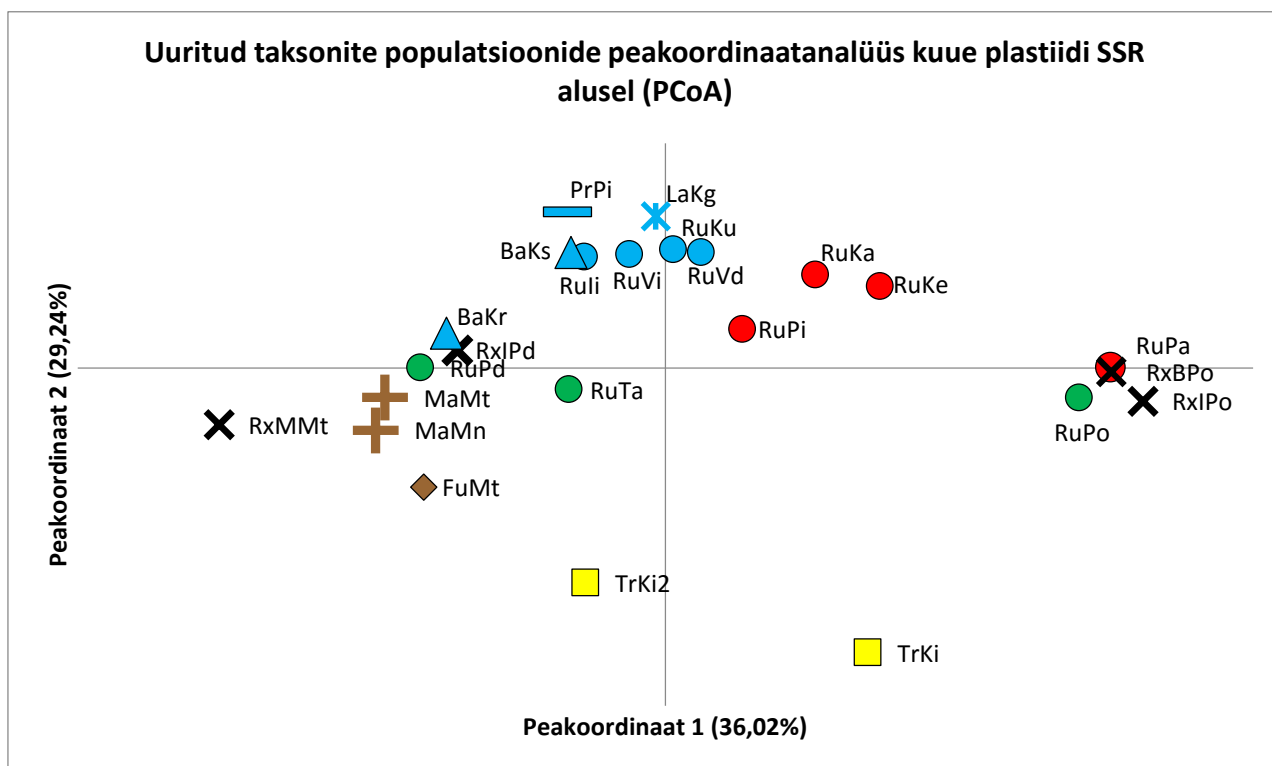
Dactylorhiza russowii, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri* geneetilise eristumise väärtused (Fst) on toodud tabelis 12. *Dactylorhiza lapponica* ja *D. traunsteineri* vaheline eristumine (Fst = 0,309) on suurem, kui *D. russowii* ja *D. traunsteineri* vahel (Fst = 0,205). Kõige vähem eristuvad omavahel *D. russowii* ja *D. lapponica* (Fst = 0,063).

Tabel 12. *Dactylorhiza russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri* geneetilise eristumise Fst väärtused kuue palstiidi SSR andmete alusel.

<i>Dactylorhiza russowii</i>			
0,000			<i>Dactylorhiza russowii</i>
0,063	0,000		<i>Dactylorhiza lapponica</i>
0,205	0,309	0,000	<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>

Kõigi uuritud populatsioonide vahelise geneetilise eristumise Fst väärtused on lisa 6. Suurim geneetiline eristumine on *D. russowii* Keila (RuKe) ja *D. traunsteineri* Kitzbühel (TrKi) populatsioonide vahel (Fst = 0,399). Samuti suur populatsioonide vaheline eristumine esineb *D. lapponica* Kugalepa (LaKg) ja *D. fuchsii* (FuMt) vahel (Fst = 0,393) (lisa 6).

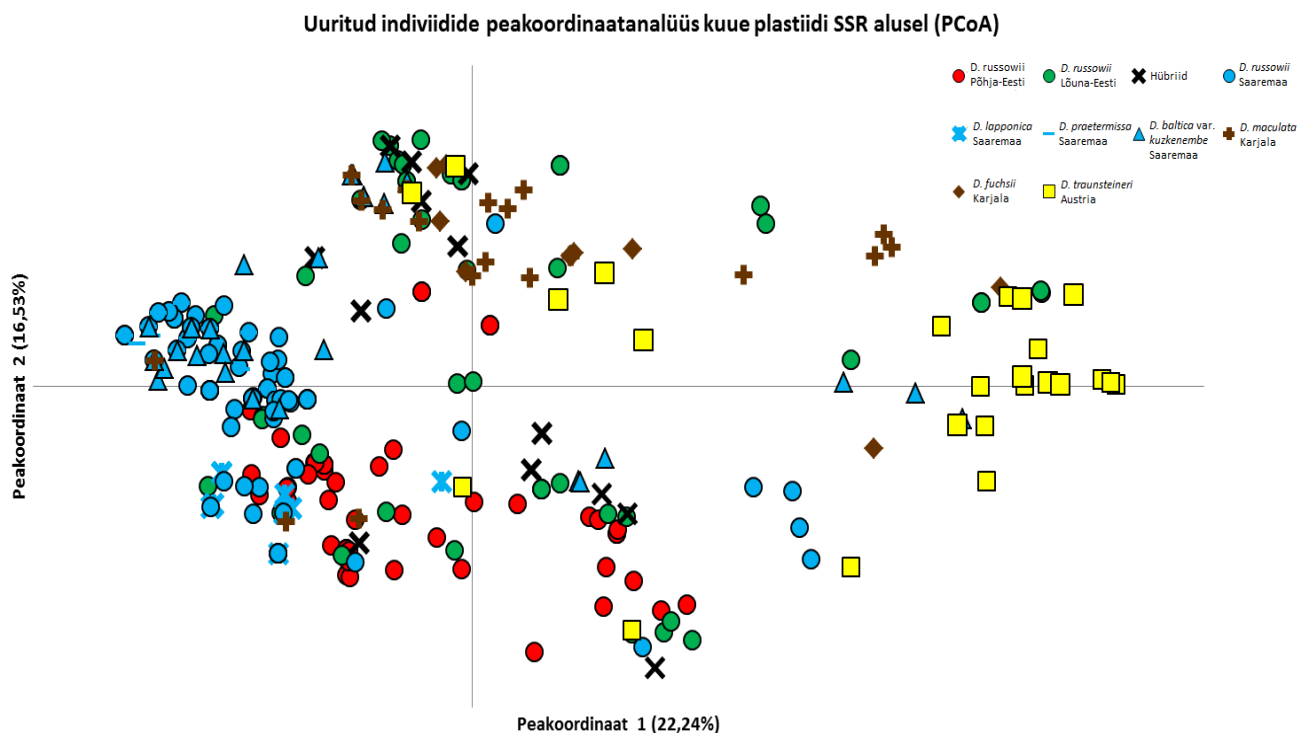
Kõigi uuritud taksonite populatsioonide kohta teostati PCoA, mida näeb joonisel 20. Saaremaa populatsioonid, välja arvatud Kuusnõmme (BaKs) on koondunud ühte rühma. Kolm Põhja-Eesti populatsiooni asuvad Saaremaa populatsioonidest veidi eraldunult. Väikese rühma on moodustunud Põhja-Eesti Palivere populatsioon (RuPa) ja Lõuna-Eesti Põlva populatsioon (RuPo), kus lisaks puhtale *D. russowii* indiviididele tuvastati hübriide. Karjala populatsioonid koos ühe Lõuna-Eesti populatsiooniga moodustavad suure rühma. *Dactylorhiza traunsteineri* populatsioonid, mis hoidsid kokku tuuma markerite andmete alusel koostatud peakoordinaat-analüüsil, on nüüd teineteisest eraldunud.



Joonis 20. Uuritud taksonite populatsioonide peakoordinaatanalüüs (PcoA) plastiidide SSR andmete alusel. Erinevate sümbolitega tähistatud populatsioonide taksonoomiline kuuluvus: ● – *D. russowii*, ■ – *D. traunsteineri*, ж – *D. lapponica*, — – *D. praetermissa*, ▲ – *D. baltica* var. *kuzkenembe*, ◆ – *D. fuchsii*, + – *D. maculata*, X – hübriidid. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud taksonite geograafiline paiknevus: Põhja-Eesti on punase värviga, Lõuna-Eesti on rohelise, Saaremaa on sinise värviga, Austria on kollase värviga, Karjala on pruuni värviga, hübriidid on musta värviga.

Kuue plastiidi SSR alusel koostatud PCoA (joonis 21) näitab tunduvalt selgemat pilti, kui PCoA tuuma SSR alusel. Enamik uuritud indiviididest on jaotunud vastavalt geograafilisele asukohale. Saaremaa populatsioonid moodustavad suure rühma, mis hoiab kokku. Karjala populatsioonide indiviidid enamjaolt moodustavad ka eraldiseisva rühma, kuhu lisanduvad mõned *D. russowii* ja *D. traunsteineri* indiviidid. Põhja-Eesti populatsioonide indiviidid on koondunud hajusasse rühma.

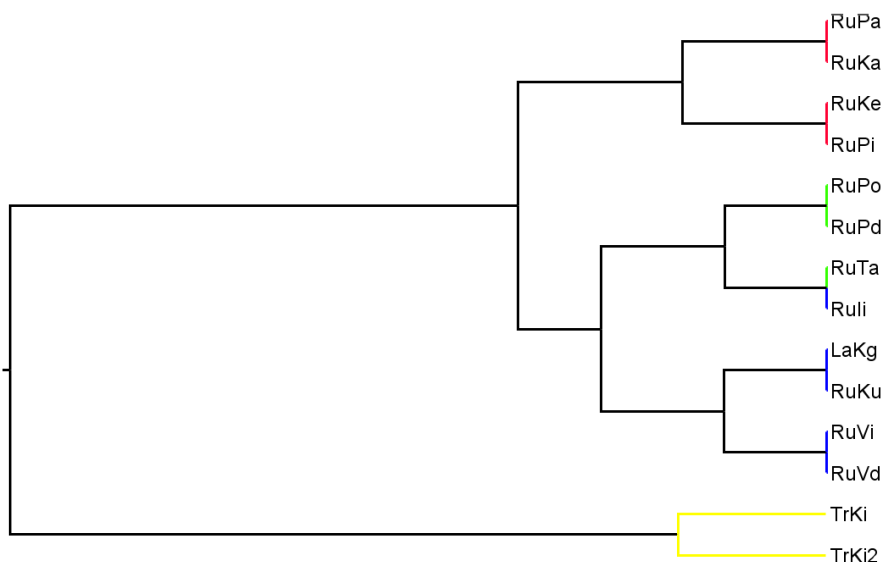
Ainult Lõuna-Eesti individid ei moodusta omaette gruppi, vaid paigutuvad laiali kogu graafiku ulatuses. Osa *D. traunsteineri* individidest moodustab ka omaette grupi.



Joonis 21. Uuritud taksonite individide peakoordinaatanalüüs (PcoA) plastiidide SSR andmete alusel. Erinevate sümbolitega tähistatud populatsioonide taksonoomiline kuuluvus: ● – *D. russowii*, ■ – *D. traunsteineri*, ж – *D. lapponica*, — – *D. praetermissa*, ▲ – *D. baltica* var. *kuzkenembe*, ◆ – *D. fuchsii*, + – *D. maculata*, X – hübriidid. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud taksonite geograafiline paiknevus: Põhja-Eesti on punase värviga, Lõuna-Eesti on roheline, Saaremaa on sinise värviga, Austria on kollase värviga, Karjala on pruuni värviga, hübriidid on musta värviga.

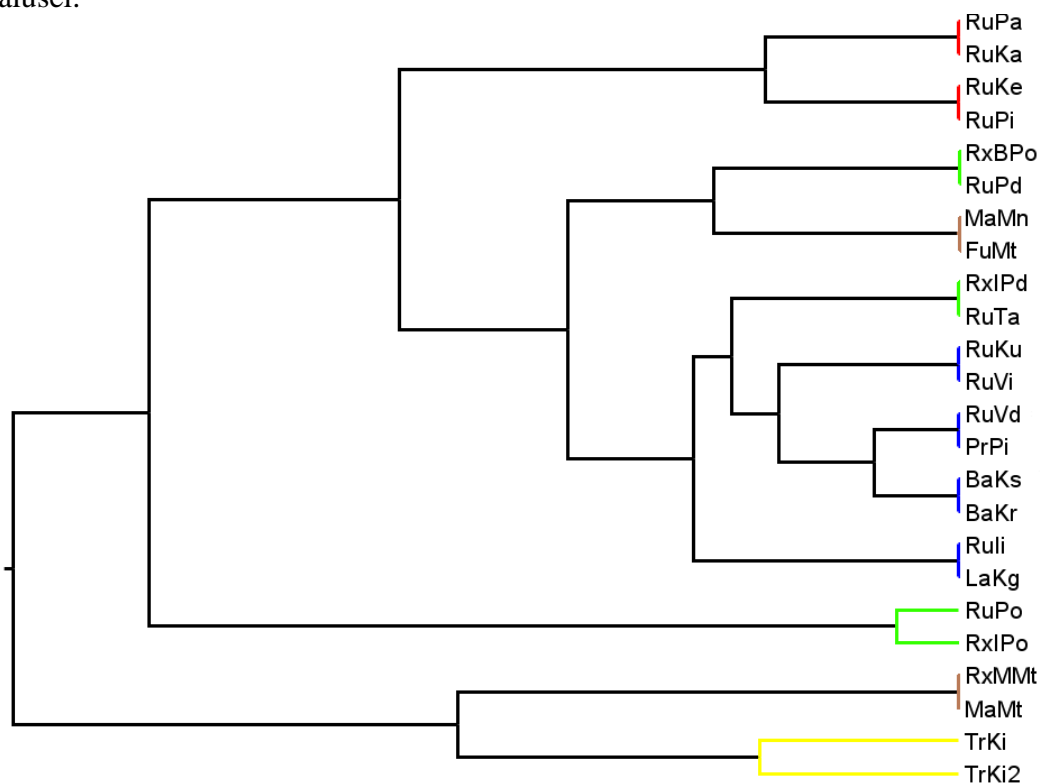
Kolme lähedase liigi plastiidide SSR andmete dendrogrammilt (joonis 22) on näha, et uuritud liigid jaotusid kolme klastrisse: *Dactylorhiza traunsteineri* moodustas eraldi sõsarrühma, ülejäänud populatsioonid moodustasid suurema klasteri, mis jagunes kaheks alamrühmaks. Plastiidide ja tuuma SSR andmete alusel tehtud dendrogrammid on väga sarnased (joonis 19, 22). Kuid plastiidide SSR dendrogrammis klaster Saaremaa populatsioonidega on paremini lahendatud.

Kõigi uuritud taksonite plastiidi SSR dendrogrammil liikidevahelist eraldumist ei tuvastatud (joonis 23). Põhja-Eesti populatsioonid eraldusid omaette rühma, Lõuna-Eesti populatsioonid olid hajutatud mitme klasteri vahel, Saaremaa populatsioonid koos kahe Lõuna-Eesti populatsiooniga koondusid eraldi rühma. Austria ja osa Karjala populatsioonidest moodustasid eraldi klasteri.



Joonis 22. Kolme lähedase liigi (*Dactylorhiza russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) geneetiliste distantside alusel koostatud UPGMA dendrogramm plastiidi SSR alusel. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud liikide geograafiline paiknevus: Põhja-Eesti on punase värviga, Lõuna-Eesti on rohelise, Saaremaa on sinise värviga, Austria on kollase värviga. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1.

Joonisel 23 on toodud kõigi uuritud taksonite koostatud dendrogrammil plastiidi SSR andmete alusel.



Joonis 23. Kõigi uuritud taksonite UPGMA dendrogramm koostatud plastiidi SSR andmete alusel. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud liikide geograafiline paiknevus: Põhja-Eesti on punase värviga, Lõuna-Eesti on rohelise, Saaremaa on sinise värviga, Austria on kollase värviga ning Karjala pruuni värviga. Populatsioonide tähistused on toodud tabelis 1.

Uuritud kahe ITS andmetel kõigi uuritud liikide geneetilise varieeruvuse näitajad on tabelis 13. Sellest tabelist on näha, et *D. russowii* on geneetiliselt varieeruvam ($N_a = 9$), kui *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*, mille keskmine alleelide arv on vastavalt $N_a = 2,5$ ja $N_a = 0,5$ (tabel 13). Teistest uuritud liikidest on suur keskmine alleelide arv $N_a = 5,5$ esineb taksonil *D. baltica* var. *kuzkenembe*. Kõigi uuritud liikide fikseerumisindeksid (F) on kõrged varieerudes 0,749 kuni 0,910 (tabel 13). Samuti leiti kõigi uuritud taksonite geneetilise varieeruvuse näitajad ning *D. russowii* populatsioonidest on kõige varieeruvam Kaasiku (RuKa) populatsioon (lisa 7).

Tabel 13. Uuritud liikide indiviidide arv (N), polümorfsete lookuste osakaal protsentides (P), keskmine alleelide arv lookuses (N_a), privaatsete alleelide arv (N_p), vaadeldud heterosügootsus (Ho), oodatav heterosügootsus (He) ning fikseerumiskoefitsient (F).

Liik	N	P	N_a	N_p	Ho	He	F
<i>D. russowii</i>	180	100	9,0	2,5	0,183	0,503	0,749
<i>D. lapponica</i>	16	50	2,5	0,0	0,031	0,349	0,910
<i>D. traunsteineri</i>	30	100	5,0	1,0	0,100	0,298	0,788
<i>D. praetermissa</i>	16	100	3,5	0,0	0,063	0,410	0,879
<i>D. baltica</i> var. <i>kuzkenembe</i>	35	100	5,5	0,0	0,243	0,446	0,668
<i>D. maculata</i>	20	100	3,5	0,5	0,125	0,314	0,605
<i>D. fuchsii</i>	11	50	2,0	0,0	0,000	0,215	1,000

Kolme lähedase liigi (*D. russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) geneetilise eristumise väärtused (F_{st}), on toodud tabelis 14. *Dactylorhiza lapponica* ja *D. traunsteineri* vaheline eristumine ($F_{st} = 0,091$) on suurem, kui *D. russowii* ja *D. traunsteineri* vahel ($F_{st} = 0,066$). Kõige vähem eristuvad omavahel *D. russowii* ja *D. lapponica* ($F_{st} = 0,031$).

Tabel 14. *Dactylorhiza russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri* geneetilise eristumise F_{st} väärtused kahe ITS andmete põhjal.

<i>Dactylorhiza russowii</i>	<i>Dactylorhiza lapponica</i>	<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	
0,000			<i>Dactylorhiza russowii</i>
0,031	0,000		<i>Dactylorhiza lapponica</i>
0,066	0,091	0,000	<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>

Populatsioonide vahelise geneetilise varieeruvuse tabelist (lisa 8) selgub, et kahe *D. russowii* populatsiooni Põlva (RuPo) ja Iide (RuIi) on suurim geneetiline eristumine ($F_{st} = 0,394$). Kõige vähem omavahel eristuvad *D. russowii* Päidlapalu (RuPd) ja *D. lapponica* Kugalepa (LaKg), $F_{st} = 0,011$.

5. Arutelu

5.1 Uuritud liikide morfoloogiline varieeruvus

Käesolevas töö eesmärgiks oli uurida Russowi sõrmkäpa morfoloogiliste tunnuste varieeruvust Eesti populatsioonides. Selle jaoks läbi viidud morfoloogiliste tunnuste analüüside tulemustest selgub, et Russowi sõrmkäpa taimed jagunevad vastavalt leviku alale kahte morfoloogilisse rühma: Lõuna-Eesti populatsioonid omaette ning Põhja-Eesti ja Saaremaa populatsioonid koos. Lõuna-Eesti populatsioonide selget eristumist Saaremaa ja Põhja-Eesti populatsioonidest näitab nii klasteranalüüsi (joonis 11) kui ka peakomponentanalüüsi tulemus (joonis 12, 13). Lõuna-Eesti taimed on kõrgemad, pikemate ja tihedamate õisikutega, pikemate ja laiemate lehtedega.

Erineva fenotüübiga isendid põhjustavad määramisel probleeme ning on raske otsustada mis on leitud morfoloogiliste tunnuste varieeruvuse taga. Samuti on teada, et *Dactylorhiza* perekonnas palju noori liike, mille morfoloogilised tunnused ei ole veel hästi eristuvad (Hedrén 2002). Arvestades *D. russowii* hübriidset päritolu, on leitud morfo-geograafilist jaotumist kõige loogilisem seletada sõltumatu korduva hübriidiseerumisega samade vanemliikide erinevate populatsioonide esindajate vahel. Teisisõnu, Saaremaa *D. russowii* on tekkinud Saaremaal kohalike *D. maculata* ning *D. incarnata* ristumise tulemusena, samas Lõuna-Eesti *D. russowii* fenotüübiga taimed on tekkinud kohapeal natuke teistsuguste tunnustega *D. maculata* ning *D. incarnata* hübriidiseerumise käigus. Lokaalne hübriidiseerumine ja selle tulemusena ulatuslik F2 põlvkonna teke ning võimalik tagasiristumine vanemliikidega (Lord & Richards 1977) võib põhjustada nii populatsioonisisest kui ka populatsioonide vahelist tunnuste varieeruvust. Lisaks sellele *Dactylorhiza* perekonnas hästi tuntud ja kirjeldatud lokaalse liigitekke protsessile võib veel oletada, et tegemist on ökoloogiliste tingimuste poolt põhjustatud fenotüübilise plastilisusega. Kasvukohatingimused (mulla viljakus, keskmine temperatuur jm.) on Lõuna-Eestis Põhja-Eesti ja Saaremaa omadest erinevad.

Morfoloogiliste tunnuste analüüsis kasutati ka Saaremaal leitud lapi sõrmkäpa (*Dactylorhiza lapponica*) taimi. Tulemuste alusel (joonis 10, 12-14) võib väita, et Eestis esinevad *D. lapponica* tüüpi taimed, mis morfoloogiliste tunnuste poolest selgelt eristuvad *D. russowii* indiviididest.

5.2 Analüüsitud liikide geneetiline mitmekesisus ning eristumine

Geneetilist mitmekesisust uuriti nelja tuuma, kuue plastiidi SSR ning kahe ITS-regiooni andmete alusel kokku 7 liigil ning kolmel hübriidisel taksonil (lisa 3, 5 ja 7). Käesoleva töö tulemused näitavad, et suurim geneetiline varieeruvus on Russowi sõrmkäpal, millel on suurim keskmine alleelide arv lookuses (tabel 8, 11 ja 14). *Dactylorhiza russowii* puhul on ka polümorfsete lookuste osakaal palju suurem kui teistel uuritud liikidel. Kahe lähedase liigi: *D. lapponica* ja *D. traunsteineri* geneetiline varieeruvus on *D. russowii* omast tunduvalt madalam.

Kolme lähedase liigi (*D. russowii*, *D. lapponica* ning *D. traunsteineri*) tuuma SSR alusel inbriidingukoefitsiendid on positiivsed ning varieeruvad (F väärtused 0, 513 kuni 0, 786). Plastiidide SSR alusel on fikseerumisindeks neil liikidel veidi kõrgem ning üsna sarnane (F väärtused 0,813 kuni 0,894). Üldiselt on teada, et kõrged positiivsed fikseerumisindeksi väärtused iseloomustavad võõrtolmlejad ja kõrged negatiivsed väärtused iseloomustavad isetolmlejad ja inbriidingu toimumist. Seega, meie uuritud lähedased liigid on enamjaolt võõrtolmlevad.

Vaadeldud (H_o) ja oodatav (H_e) heterosügootsus on näitajad, mis iseloomustavad populatsioonide geneetilist mitmekesisust. Kõigi uuritud liikide puhul oli oodatav heterosügootsus (H_e) suurem kui vaadeldud heterosügootsus (H_o). Kõige madalam keskmine geneetiline mitmekesisus plastiidide SSR alusel on liigil *Dactylorhiza traunsteineri* ($H_o = 0,089$ ja $H_e = 0,429$). Balao et al. (2015) mikrosatelliitanalüüsil põhinevas töös tuuakse välja, et *D. traunsteineri s. l.* keskmine oodatav ning vaadeldud heterosügootsus on 0,68.

Kolme lähedase liigi (*Dactylorhiza russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) molekulaarse varieeruvuse jaotuse analüüsi tulemus (joonis 15) näitas, et populatsioonide sisene geneetiline varieeruvus (84%) on suurem kui populatsioonide vaheline (16%). Selline protsentuaalne suhe näitab, et populatsioonide sees esineb suur varieeruvus, kuid populatsioonid omavahel ei ole väga erinevad, mis ongi iseloomulik võõrtolmlevate liikidele.

Uuritud liikide populatsioonide geneetilise varieeruvuse näitajad tuuma SSR andmetel on mõõdukalt varieeruvad, keskmine alleelide arv N_a varieerub 2,75 (LaKg ja RuPi populatsioonidel) kuni 6,5 RuPo puhul (lisa 3). *Dactylorhiza russowii* populatsioonidest kõrgema geneetilise varieeruvusega on Lõuna-Eesti populatsioonid: Põlva (RuPo) populatsioon, mille keskmine alleelide arv $N_a = 6,5$ ning privaatsete alleelide arv $N_p = 1,5$ (nende kahe näitaja väärtused on suurimad üle kõikide uuritud taksonite populatsioonide) ning Tatra (RuTa), mille keskmine alleelide arv $N_a = 5,5$ ja privaatsete alleelide arv $N_p = 0,5$. *Dactylorhiza traunsteineri* kahest uuritud populatsioonist on suurema geneetilise varieeruvusega Kitzbühel 2 (TrKi2), mille $N_a =$

4,5 ja $N_p = 0,25$). Samuti on suur geneetiline varieeruvus Karjala *D. maculata* Mandra (MaMn) populatsioonis ($N_a = 4,5$, $N_p = 0,75$).

Plastiidi ja ITS andmete põhjal tuvastatud geneetilise varieeruvuse näitajate suhteline monomorfus ei võimalda selgitada mis geograafilise asukohaga liikide populatsioonid oleksid geneetiliselt varieeruvamad.

Nii tuuma kui ka plastiidide SSR alusel läbi viidud PCoA tulemustel on mõned *D. russowii* populatsioonid (RuPo, RuPa ning RuPd) selgelt eristunud ülejäänud *D. russowii* populatsioonidest. Palivere (RuPa) ja Põlva (RuPo) populatsioonide omavaheline eristumine on väga väike, $F_{st} = 0,056$. Tähelepanuväärne on see, et Palivere *D. russowii* ja Kugalepa *D. lapponica* (LaKg) populatsioonid eristuvad kõige rohkem ($F_{st} = 0,438$). Ilmnes, et *Dactylorhiza russowii* populatsioonid jaotuvad kaheks rühmaks: lapi sõrmkäpast geneetiliselt kaugem populatsioonide rühm ning teine, geneetiliselt lähedaste populatsioonide rühm, mille F_{st} väärtused varieeruvad 0,045 kuni 0,218.

5.2.3 Russowi sõrmkäpa (*Dactylorhiza russowii*) identiteet

Üheks töö eesmärgiks oli tuvastada *D. russowii* liigisisene geneetiline varieeruvus Eesti populatsioonides ning selgitada kas Russowi sõrmkäpp geneetiliselt eristub teistest lähedastest liikidest (*D. lapponica* ja *D. traunsteineri*). Tulemustest selgub, et *D. russowii* on kõrge geneetilise varieeruvusega, kuid geneetiliselt väga lähedane teiste *D. traunsteineri* kompleksi esindajatega (*D. lapponica* ja *D. traunsteineri*).

Nii tuuma kui ka plastiidi SSR andmete alusel *Dactylorhiza russowii* ja *D. lapponica* selgelt ei eristu. Samuti hiljuti läbiviidud uurimuses Nordström & Hedrén (2008) poolt plastiidi DNA andmetel kolme lähedase liigi vahel geneetilist lahknemist ei ilmnenud. Samas meie plastiidide DNA tulemuste järgi on *D. russowii* ja *D. lapponica* ühtsest rühmast ja *D. traunsteineri* on mõnevõrra eristunud. Kolme erineva geneetilise markeri (tuuma- ja plastiidimarkerite ning ITS) põhjal arvatud geneetilise eristumise F_{st} väärtused näitavad, et *Dactylorhiza lapponica* ja *D. traunsteineri* vaheline eristumine on alati suurem, kui *D. russowii* ja *D. traunsteineri* vahel. Kõige vähem eristuvad omavahel *D. russowii* ja *D. lapponica*. F_{st} väärtused on seejuures alla 0,35 ning arvestades seda, et tavaliselt peetakse $F_{st} = 0$ juures liike identseteks ja väärtuse 1 juures absoluutselt erinevateks liikideks, võib sellest järeldada, et need kolm liiki on ikkagi geneetiliselt suhteliselt lähedased omavahel. Käesolev järeldus on kooskõlas hiljuti avaldatud Balao et al. (2015) uurimuse tulemustega, mille järgi vaatamata *Dactylorhiza traunsteineri* s.l. indiviidide fenotüübilise eristumisele selget geneetilist differentseerumist ei leitud.

Antud töös üüritati tuvastada kas geneetilise mitmekesisuse jaotus on seotud populatsioonide geograafilise asukohaga. Kolme *D. traunsteineri* kompleksi kuuluva liikide (*D. russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) kohta tuuma mikrosatelliitide andmete alusel koostatud UPGMA dendrogrammilt (joonis 18) saab tuvastada liikide geograafilise jaotuse. Austria *D. traunsteineri* on eraldi sõsarrühmana ja ülejäänud uuritud populatsioonid jaotusid kaheks rühmaks: *D. russowii* Põhja-Eesti populatsioonid ning Lõuna-Eesti ja Saaremaa (kus oli üks *D. lapponica* populatsioon). Plastiidide SSR andmete alusel koostatud UPGMA dendrogramm (joonis 22) on paremini lahendunud Saaremaa populatsioonide suhtes, kuid on säilinud liikide samasugune geograafiline jaotus. Ka kõigi uuritud taksonite dendrogrammidel (joonis 19, 23) on samuti näha teatud geograafilist rühmade jaotumist, kuid liigid omavahel selgelt ei eristu.

Üks töö eesmärkidest oli kontrollida kas Russowii sõrmkäpa morfoloogiline varieeruvus on korreleeritud geneetilise varieeruvusega. Selgus, et uuritud taksonite geneetiline varieerumine ei ole üheselt kooskõlas morfoloogilise eristumisega. Näiteks *D. russowii* ja *D. lapponica* morfoloogiliselt eristusid hästi (tabel 5, joonised 11-14) kuid nende populatsioonide geneetiline eristumine oli väga väike (tabel 10, 12 ja 14). Siin võib oletada, et geneetiline diferentseerumine ei ole veel jõudnud nii kaugele, kui morfoloogiline ning tegemist on pigem liigisiseste taksonitega, nt alamliikidega, mitte välja kujunenud eriliikidega.

Seega, võttes arvesse saadud tulemusi võib järeldada, et käesoleva töö tulemus on heas kooskõlas varem tehtud uuringutega ja nende pakkumisega tunnistada kolm lähedast liiki (*D. russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) üheks taksoniks *D. majalis* ssp. *lapponica* (Nordström & Hedrén 2008, 2009).

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli hinnata ja võrrelda Russowi sõrmkäpa (*Dactylorhiza russowii*) ja lapi sõrmkäpa (*D. lapponica*) morfoloogilist varieeruvust Eesti populatsioonides. Töös seati eesmärgiks ka tuvastada Russowi sõrmkäpa populatsioonide vahelist geneetilist varieeruvust ning geneetilist eristumist lähedastest liikidest lapi sõrmkäpa (*Dactylorhiza lapponica*) ja ahtalehise sõrmkäpa (*Dactylorhiza traunsteineri*) mikrosatelliitanalüüsi meetodil. Samuti oli eesmärgiks tuvastada kas geneetilise mitmekesisuse jaotus on seotud populatsioonide geograafilise asukohaga.

Morfoloogiliste tunnuste analüüsiks mõõdeti 12 tunnust 216 indiviidil 12-st populatsioonist üle Eesti. Tulemuseks leiti, et Russowi sõrmkäpa individid jagunevad vastavalt leviku alale kahte morfoloogilisse rühma: Lõuna-Eesti ning Põhja-Eesti ja Saaremaa. Lõuna-Eesti taimede mõõtudel on suuremad Põhja-Eesti ja Saaremaa taimedest. Samuti leiti, et Saaremaal esinev *D. lapponica* on morfoloogiliste tunnuste alusel selgelt eristuv *D. russowii* individidest.

Geneetilise varieeruvuse tuvastamiseks analüüsiti nii tuuma, kui ka plastiidi SSR ning ITS varieeruvust 321 indiviidi puhul 19 populatsioonist Eestist, Karjalast ning Austriast. Tulemuseks leiti, et Russowi sõrmkäpa geneetiline varieeruvus on kõrgem kui tema lähedaste liikide lapi sõrmkäpa ja ahtalehise sõrmkäpa oma. Samuti leiti, et Russowi sõrmkäpp on geneetiliselt väga lähedane lapi ja ahtalehisele sõrmkäpale ning kõige vähem eristuvad omavahel Russowi ja lapi sõrmkäpp. Vaatamata sellele, et morfoloogiliselt *D. russowii* ja *D. lapponica* eristusid hästi, oli nende populatsioonide geneetiline eristumine väga väike.

Käesoleva töö tulemused on heas kooskõlas varem tehtud uuringutega ja toetavad nende pakkumist tunnistada kolm lähedast liiki (*D. russowii*, *D. lapponica* ja *D. traunsteineri*) üheks taksoniks *D. majalis* ssp. *lapponica*.

Summary

The aim of this study was to assess and compare the Narrow-leaved marsh orchid (*Dactylorhiza russowii*) and the Lapland marsh orchid (*D. lapponica*) morphological variability of the Estonian populations and to identify *D. russowii* and closely related *Dactylorhiza lapponica* and *Dactylorhiza traunsteineri* genetic variation. Besides, we try to examine whether the distribution of genetic diversity is associated with the geographical location of populations.

Different morphometric analyses were performed with 12 measured variables of 216 individuals from 12 population all over Estonia. We found that *Dactylorhiza russowii* individuals were divided according to the distribution range into two morphological groups: the South-Estonia and North-Estonia and Saaremaa. Our results showed the presence of *Dactylorhiza lapponica* on the island of Saaremaa () wich was morphologically clearly distinguished from *D. russowii*.

Microsatellite analysis was used to evaluate genetic variability in 321 individuals from 19 populations from Estonia, Karelia, and Austria. The genetic variability of *D. russowii* was higher than in close related *Dactylorhiza lapponica* and *D. traunsteineri*. *Dactylorhiza russowii* and *D. lapponica* morphologically well differentiated, but genetic differentiation of their populations was small. Our results are consistent with earlier studies and support the recognition of three close species (*D. russowii*, *D. lapponica* and *D. traunsteineri*) as one taxon *D. majalis* ssp. *lapponica*.

Tänuõnad

Sooviksin eriti tänada oma juhendajat Tatjana Oja tema toetava suhtumise ja kannatlikkuse eest. Lisaks tänan laborant Natalja Kirsanovat, kes aitas teostada laboratoorseid töid, Margarita Mürki optimeeritud praimerite eest ning Lisanna Schmidt, kes aitas teha statistilist analüüsi. Samuti tänan Tarmo Piknerit igakülgse abi eest ning Sergei Znamenskit Karjala proovide eest. Kindlasti olen tänulik Toomas Hirsele, kes juhatas Lõuna-Eesti populatsioonide juurde ja aitas taimede määramisel.

Kasutatud kirjandus

- Andersson, E., 1996. Morphological variation in the orchid *Dactylorhiza traunsteineri*: Scale and systematic implications. *PhD thesis*. Uppsala. 25pp.
- Andersson, E., 1994. On the identity of orchid populations: a morphometric study of the *Dactylorhiza traunsteineri* complex in eastern Sweden. *Nordic Journal of Botany*. 14: 269–275.
- Averyanov, L. V., 1990. A review of the genus *Dactylorhiza*. In: J. Arditti (ed.), *Orchid biology: reviews and perspectives*. Timber Press. pp.159–206.
- Averyanov, L. V. 1990b. A review of genus *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski (Orchidaceae), 3. *Novosti sistematiki vysshikh rastenij* 27: 32-62. [In Russian.]
- Averyanov, L. V. 1991. The origin and some evolutionary, biological and ecological features of the orchids (Orchidaceae). *SpB. Izd. Nauka. Botanicheskij žurnal*. T. 76. № 10. Ctp. 1345 – 1359. [In Russian.]
- Averyanov, L. V. 2000. Orchids (*Orchidaceae*) of the Middle Russia. *Turczaninowia*. 3 (1): 30-53. [In Russian.]
- Balao, F. et al., 2015. Genetic differentiation and admixture between sibling allopolyploids in the *Dactylorhiza majalis* complex. *Heredity*, pp.1–11.
- Bateman, R. M., Denholm, I. 1983. A reappraisal of the British and Irish dactylorchids 1. The tetraploid marsh-orchids. *Watsonia* 14: 347- 376.
- Bateman, R. M., & Denholm, I. 2003. The Heath Spotted-orchid (*Dactylorhiza maculata* (L.) Soó) in the British Isles: a cautionary case-study in delimitating infraspecific taxa and inferring their evolutionary relationships. *J. Eur. Orchideen*, 35(1), 3-36.
- Bateman, R. M.; Hollingsworth, P. M.; Preston, J.; Luo, Y. B.; 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.
- Chambers, G.K. & MacAvoy, E.S., 2000. Microsatellites: Consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 126(4), pp. 455–476.
- Cullings, K. W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1: 233-240.
- Devos, N., Tyteca, D., Raspé, O., Wesselingh, R. A. and Jacquemart, A. L. 2003. Patterns of chloroplast diversity among western European *Dactylorhiza* species (*Orchidaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 243(1-2), pp.85-97.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Delforge, P. 2001. *Guide des Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient.*, 2nd ed. Delachaux et Niestlé Ed. Neuchâtel-Paris.
- Delforge, P., 2006. *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East.*, Timber Press, Oregon.

640 pp.

- Dray, S., Dufour, A. B. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*. 22: 1-20.
- Dressler, R.L., 1981. *The orchids. Natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.
- Hedrén, M., 2003. Plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* polyploid complex and the origin of allotetraploid *D. sphagnicola* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, 12(10), pp. 2669–2680.
- Hedrén, M. 2002. Speciation patterns in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* polyploid complex (Orchidaceae): evidence from molecular markers. *J. Eur. Orchid.* 34: 707–731.
- Hedrén, M., Nordström, S., Ståhlberg, D. 2008. Polyploid evolution and plastid DNA variation in *Dactylorhiza incarnata/maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia. *Molecular Ecology*. Vol 17. pp.5075-5091.
- Hedrén, M., 2001. Systematics of the *Dactylorhiza euxina/incarnata/maculata* polyploid complex (Orchidaceae) in Turkey: Evidence from allozyme data. *Plant Systematics and Evolution*, 229(1-2), pp.23–44.
- Jarne, P. and Lagoda, P.J. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 11(10), pp.424-429.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R. and Dhawan, A.K., 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), pp.309-334.
- Klinge, J. 1893. Revision der *Orchis cordigera* Fries und *Orchis angustifolia* Rchb.: Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctors der Botanik verfasst und mit Bewilligung Einer Hochverordneten Physiko-mathemat. Facultät der Kaiserlichen Universität zu Jurjew (Dorpat) zur öffentlichen Vertheidigung bestimmt.
- Klinge, J. 1899. *Die homo-und polyphyletischen Formenkreise der Dactylorchis-Arten*. Typo-Litografija" Gerol'da".
- Koutecky, 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. Atlas of the Estonian Flora. Tartu: Eesti Maaülikool. 528 lk.
- Kull, T., Tuulik, T. 2002. Kodumaa käpalised. Tallinn: Digimap. 95 lk.
- Kuusk, V. 1984. Perekond *Dactylorhiza*. In: Eichwald, K., Kukk, E., Kuusk, V., Lellep, E., Mäemets, A., Rebassoo, H., Sander, R., Talts, S., Trei, T., Viljasoo, L. Eesti NSV flora. IX. Tallinn, Valgus. 448 lk.
- Ligges, U., Mächler, M. 2003. Scatterplot3d - an R Package for Visualizing Multivariate Data. *Journal of Statistical Software* 8: 1-20.
- Lord, R.M. and Richards, A.J., 1977. A hybrid swarm between the diploid *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó and the tetraploid *D. purpurella* (T. & TA Steph.) Soó in Durham. *Watsonia*, 11(3), pp.205-210.

- McGlaughlin, M. E., Wallace, M.E., Helenurm, K. 2008. Isolation of microsatellite loci from the endangered plant *Sibara filifolia* (Brassicaceae). *Molecular Ecology Resources* 8: 367-369.
- Morgante, M. & Olivieri, M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 3(1), pp.175–182.
- Nordström, S. & Hedrén, M., 2007. Development of polymorphic nuclear microsatellite markers for polyploid and diploid members of the orchid genus *Dactylorhiza*. *Molecular Ecology Notes*, 7, pp.644–647.
- Nordström, S. & Hedrén, M., 2008. Genetic differentiation and postglacial migration of the *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri/laponica* complex into Fennoscandia. *Plant Systematics and Evolution*, 276(1-2), pp.73–87.
- Nordström, S. & Hedrén, M., 2009. Genetic diversity and differentiation of allopolyploid *Dactylorhiza* (Orchidaceae) with particular focus on the *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri/laponica* complex. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97(1), pp.52–67.
- Paun, O., Luna, J.A., Fay, M.F., Bateman, R.M., Chase, M.W. 2010. Genomic responses drive adaptation in allotetraploid species of *Dactylorhiza* (Orchidaceae; Orchidinae). Aarhus University Press, Denmark. pp. 169-192.
- Paun, O., Bateman, R.M., Fay, M.F., Luna, J.A., Moat, J., Hedrén, M. and Chase, M.W., 2011. Altered gene expression and ecological divergence in sibling allopolyploids of *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), p.1.
- 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.
- Pedersen, H.Æ., 1998. Species concept and guidelines for infraspecific taxonomic ranking in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany*, 18, pp.289–310.
- Pedersen, H., Hedrén, M. and Bateman, R.M., 2003. Proposal to conserve the name *Orchis majalis* against *O. elata*, *O. vestita*, and *O. sesquipedalis* (*Dactylorhiza*: Orchidinae: Orchidaceae). *Taxon*, 52(3), pp.633-634.
- Pikner, T. 2013. Eesti orhideed. Tallinn: Varrak. 261 lk.
- Pillon, Y., Fay, M., et al., 2007. Evolution and temporal diversification of western European polyploid species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Taxon*, 56(4), pp.1185–1208.
- Provan, J. et al., 2001. Chloroplast microsatellites : new tools for studies in plant ecology and evolution. , 16(3), pp.142–147.
- Selkoe, K.A. & Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), pp.615–629.
- Smoljaninova, L.A., 1976. *Dactylorhiza* Nevski. *Flora Evropejskoj chasti SSSR*, 2, pp.49-57.
- Schmeidt, O. 1996. Eestimaa orhideed. Tallinn: Varrak. 144 lk.
- Shipunov, A. B., Fay, M. F., Pillon, Y., Bateman, R. M., & Chase, M. W. 2004. *Dactylorhiza* (Orchidaceae) in European Russia: combined molecular and morphological analysis. *American Journal of Botany*, 91(9), 1419-1426.
- Soó, R.D., 1980. *Dactylorhiza* Necker ex Nevski. In: Tutin, T. G. et al. (eds) *Flora Europaea*, 5.

Cambridge Univ. Press, pp.333-337.

Ståhlberg, D. & Hedrén, M., 2008. Systematics and phylogeography of the *Dactylorhiza maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia: Insights from cytological, morphological and molecular data. *Plant Systematics and Evolution*, 273(1-2), pp.107–132.

Tatarenko, I.V., 1996. Orchids of Russia: life forms, biology, protection. Moscow: Argus. 206 pp. [In Russian]

Tuulik, T. (koost.) 1998. Hiiumaa orhideed. Tallinn: Riigi Teataja Kirjastuse Trükikoda. 134 lk.

Tzvelev N.N. 2000. Manual of the vascular plants of North-West Russia (Leningrad, Pskov and Novgorod provinces). — St. Petersburg: State Chemical-Pharmaceutical Academy Press. 781 pp. (in Russian).

Vakhrameeva, M.G. et al., 2008. Orchids of Russia and Adjacent Countries: (within the Borders of the Former USSR), Liechtenstein: Gantner. 690 p.

Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*, 11, pp.1–16.

Kasutatud veebiaadress.

eElurikkus. Russowi sõrmkäpp. [<http://elurikkus.ut.ee/kirjeldus.php?lang=est&id=4237>]
20.05.2016

Lisad

Lisa 1. Russowi sõrmkäpa (*Dactylorhiza russowii*) Lõuna-Eestist, lapi sõrmkäpa (*D. lapponica*) Saaremaalt ja ahtalehise sõrmkäpa (*D. traunsteineri*) Austriast õisiku lähifotod.

Lisa 2. Lõuna-Eestis leitud oletatavate *Dactylorhiza russowii x incarnata* ja *D. russowii x baltica* taime õisiku lähifotod.

Lisa 3. Uuritud taksonite populatsioonide geneetilise varieeruvuse näitajad nelja tuuma SSR alusel.

Lisa 4. Populatsioonide vahelised eristumise väärtused (Fst) nelja tuuma SSR alusel.

Lisa 5. Uuritud taksonite populatsioonide geneetilise varieeruvuse näitajad kuue plastiidi SSR alusel.

Lisa 6. Populatsioonide vahelised eristumise väärtused (Fst) kuue plastiidi SSR alusel.

Lisa 7. Uuritud taksonite populatsioonide geneetilise varieeruvuse näitajad kahe ITS-järjestuse andmete alusel.

Lisa 8. Populatsioonide vahelised eristumise väärtused (Fst) kahe ITS andmete alusel.

Lisa 1. Kolme lähedase sõrmkäpa õisikute fotod. Vasakul on Russowi sõrmkäpp (*Dactylorhiza russowii*) Lõuna-Eestis. Foto autor T. Hirse. Keskel on lapi sõrmkäpp (*Dactylorhiza lapponica*) Saaremaal ja paremal on ahtalehine sõrmkäpp (*Dactylorhiza traunsteineri*). Fotode autor on T. Pikner



Lisa 2. Lõuna-Eestis leitud oletatavate *Dactylorhiza russowii x incarnata* (vasakul) ja *D. russowii x baltica* (paremal) taime õisiku lähifotod. Fotode autor on T. Hirse



Lisa 3. Uuritid taksonite populatsioonide geneetilise varieeruvuse näitajad nelja tuuma lookuse andmetel. Uuritid isendite arv populatsioonis (N), polümorfsete lookuste osakaal % (P), keskmine alleelide arv lookuses (Na), privaatsete (ühele populatsioonile unikaalsete) alleelide arv (Np), vaadeldud heterosügootsus (Ho), oodatav heterosügootsus (He) ning inbriidingukoefitsient (F).

Liik	Populatsioon	N	P	Na	Np	Ho	He	F	
<i>Dactylorhiza russowii</i>	Palivere (RuPa)	13	100	4,500	0,750	0,214	0,525	0,550	
	Kaasiku (RuKa)	17	100	4,750	0,000	0,485	0,483	0,179	
	Keila (RuKe)	18	75	4,500	1,000	0,236	0,402	0,422	
	Pikavere (RuPi)	10	100	2,750	0,250	0,050	0,280	0,643	
	Põlva (RuPo)	13	100	6,500	1,500	0,288	0,658	0,524	
	Päidlapalu (RuPd)	20	100	3,750	0,000	0,315	0,487	0,453	
	Tatra (RuTa)	18	100	5,500	0,500	0,335	0,592	0,377	
	Iide (RuIi)	14	75	4,000	0,000	0,214	0,373	0,566	
	Kugalepa (RuKu)	17	100	4,000	0,250	0,225	0,492	0,600	
	Viieristi (RuVi)	19	100	4,500	0,000	0,132	0,438	0,778	
	Viidu (RuVd)	20	75	5,000	0,000	0,238	0,495	0,482	
		Keskmine	93,18	93,18	4,523	0,386	0,248	0,475	0,507
	<i>Dactylorhiza russowii x incarnata</i>	Põlva (RxIPo)	3	100	3,250	0,000	0,542	0,618	0,118
		Päidlapalu (RxIPd)	6	100	3,000	0,000	0,250	0,483	0,411
		Keskmine	100	100	3,125	0,000	0,396	0,550	0,264
<i>Dactylorhiza russowii x baltica</i>	Põlva (RxBPo)	1	25	1,250	0,000	0,250	0,125	-1,000	
<i>Dactylorhiza russowii x maculata</i>	Matrosy (RxMMt)	2	25	1,250	0,000	0,125	0,125	1,000	
<i>Dactylorhiza lapponica</i>	Kugalepa 1 (LaKg)	16	100	2,750	0,000	0,063	0,247	0,388	
<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	Kitzbühel 1 (TrKi)	19	100	4,250	0,250	0,344	0,582	0,415	
	Kitzbühel 2 (TrKi2)	11	100	4,500	0,250	0,307	0,659	0,544	
		Keskmine	100	100	4,375	0,250	0,326	0,620	0,479
<i>Dactylorhiza praetermissa</i>	Pilguse (PrPi)	15	75	3,500	0,500	0,082	0,344	0,760	
<i>Dactylorhiza baltica</i>	Kuusnõmme (BaKs)	21	75	4,250	0,250	0,119	0,365	0,739	
	Kaarmise (BaKr)	14	100	4,250	0,000	0,161	0,559	0,762	
		Keskmine	87,5	87,5	4,250	0,125	0,140	0,462	0,750
<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	Matrosy (FuMt)	10	100	5,250	0,750	0,205	0,663	0,648	
<i>Dactylorhiza maculata</i>	Mandera (MaMn)	11	100	4,500	0,750	0,278	0,619	0,557	
	Mandera (MaMt)	7	100	3,750	0,500	0,469	0,557	0,020	
		Keskmine	100	100	4,125	0,625	0,374	0,588	0,288

Lisa 4. Populatsioonide vahelised eristumise väärtused (Fst) nelja tuuma SSR põhjal. Mida suurem on väärtus, seda kaugemad populatsioonid on omavahel. Mida väiksem on väärtus, seda lähedasemad on populatsioonid.

RuPa	RuKa	RuKe	RuPi	RuPo	RuPd	RuTa	RuLi	LaKg	RuKu	RuVi	RuVd	PrPi	BaKs	BaKr	MaMn	FuMt	MaMt	TrKi	TrKi2	
0,000																				RuPa
0,296	0,000																			RuKa
0,407	0,170	0,000																		RuKe
0,366	0,153	0,158	0,000																	RuPi
0,056	0,239	0,318	0,338	0,000																RuPo
0,319	0,077	0,172	0,165	0,260	0,000															RuPd
0,242	0,083	0,176	0,115	0,208	0,045	0,000														RuTa
0,411	0,185	0,160	0,189	0,321	0,110	0,130	0,000													RuLi
0,438	0,218	0,137	0,178	0,369	0,168	0,181	0,056	0,000												LaKg
0,319	0,118	0,129	0,118	0,257	0,066	0,058	0,086	0,134	0,000											RuKu
0,350	0,104	0,084	0,083	0,287	0,086	0,090	0,049	0,045	0,058	0,000										RuVi
0,337	0,107	0,115	0,144	0,264	0,070	0,097	0,076	0,062	0,062	0,034	0,000									RuVd
0,357	0,210	0,345	0,312	0,330	0,191	0,185	0,354	0,318	0,205	0,233	0,236	0,000								PrPi
0,387	0,190	0,329	0,276	0,322	0,173	0,161	0,333	0,290	0,192	0,215	0,205	0,314	0,000							BaKs
0,286	0,111	0,166	0,164	0,232	0,081	0,069	0,120	0,159	0,093	0,095	0,090	0,183	0,086	0,000						BaKr
0,256	0,142	0,186	0,228	0,204	0,121	0,124	0,203	0,228	0,151	0,148	0,113	0,217	0,218	0,130	0,000					MaMn
0,239	0,150	0,209	0,228	0,186	0,111	0,111	0,207	0,255	0,147	0,171	0,130	0,213	0,223	0,137	0,067	0,000				FuMt
0,310	0,154	0,134	0,214	0,240	0,114	0,124	0,200	0,243	0,149	0,152	0,107	0,214	0,216	0,142	0,116	0,082	0,000			MaMt
0,275	0,188	0,294	0,302	0,214	0,145	0,136	0,294	0,343	0,224	0,243	0,212	0,306	0,282	0,194	0,110	0,067	0,156	0,000		TrKi
0,231	0,142	0,263	0,279	0,182	0,138	0,130	0,269	0,317	0,208	0,212	0,187	0,277	0,269	0,176	0,091	0,067	0,144	0,027	0,000	TrKi2

Lisa 5. Uuritud indiviidide populatsioonide geneetilise varieeruvuse näitajad kuue plastiidi SSR alusel.

Liiik	Populatsioon	N	P	Na	Np	Ho	He	F
<i>Dactylorhiza russowii</i>	Palivere (RuPa)	13	66,67%	2,667	0,167	0,13	0,329	0,63
	Kaasiku (RuKa)	17	83,33%	3,333	0,5	0,294	0,372	0,11
	Keila (RuKe)	18	83,33%	2,833	0,167	0,185	0,265	0,613
	Pikavere (RuPi)	10	83,33%	2,833	0	0,117	0,433	0,751
	Põlva (RuPo)	13	100,00%	3,333	0	0,141	0,427	0,821
	Päidlapalu (RuPd)	19	83,33%	3,333	0,167	0,091	0,443	0,837
	Tatra (RuTa)	17	100,00%	3,333	0	0,099	0,589	0,817
	Iide (RuIi)	14	83,33%	2,333	0,167	0,143	0,344	0,531
	Kugalepa (RuKu)	17	83,33%	3,5	0,167	0,039	0,399	0,92
	Viieristi (RuVi)	19	100,00%	3,167	0,167	0,079	0,386	0,775
	Viidu (RuVd)	20	83,33%	3,833	0	0,058	0,493	0,902
	Keskmine		86,36%	3,1361818	0,1365455	0,1250909	0,4072727	0,7006364
<i>Dactylorhiza russowii x incarnata</i>	Põlva (RxIPo)	3	50,00%	1,833	0	0	0,306	1
	Päidlapalu (RxIPd)	6	83,33%	2,833	0	0,056	0,522	0,894
	Keskmine		66,67%	2,333	0,000	0,028	0,414	0,947
<i>Dactylorhiza russowii x maculata</i>	Matrosy (RxMMt)	2	33,33%	1,333	0,167	0,000	0,167	1,000
<i>Dactylorhiza lapponica</i>	Kugalepa 1 (LaKg)	16	66,67%	2,167	0,167	0,031	0,229	0,604
<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	Kitzbüchel 1 (TrKi)	19	100,00%	4	0,667	0,105	0,388	0,788
	Kitzbüchel 2 (TrKi2)	11	100,00%	3,667	0,333	0,091	0,548	0,725
	Keskmine		100	3,8335	0,5	0,098	0,468	0,7565
<i>Dactylorhiza praetermissa</i>	Pilguse (PrPi)	16	66,67%	2	0	0,083	0,267	0,656
<i>Dactylorhiza baltica</i>	Kuusnõmme (BaKs)	21	100,00%	5	0,5	0,167	0,519	0,737
	Kaarmise (BaKr)	14	100,00%	4,667	0,833	0,096	0,567	0,822
	Keskmine		100,00%	4,8335	0,6665	0,1315	0,543	0,7795
<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	Matrosy (FuMt)	11	100,00%	3,167	0,167	0,015	0,455	0,957
<i>Dactylorhiza maculata</i>	Mandera (MaMn)	12	100,00%	4,5	0,5	0,097	0,563	0,826
	Mandera (MaMt)	8	83,33%	3,333	0,167	0,063	0,486	0,889
	Keskmine		91,67%	3,9165	0,3335	0,08	0,5245	0,8575

Lisa 6. Populatsioonide vahelised eristumise väärtused (Fst) kuue plastiidi SSR põhjal. Mida suurem on väärtus, seda kaugemad populatsioonid on omavahel. Mida väiksem on väärtus, seda lähedasemad on populatsioonid.

RuPa	RuKa	RuKe	RuPi	RuPo	RuPd	RuTa	RuLi	LaKg	RuKu	RuVi	RuVd	PrPi	BaKs	BaKr	MaMn	FuMt	MaMt	TrKi	TrKi2	
0,000																				RuPa
0,214	0,000																			RuKa
0,151	0,172	0,000																		RuKe
0,236	0,115	0,179	0,000																	RuPi
0,053	0,221	0,156	0,204	0,000																RuPo
0,344	0,244	0,250	0,139	0,266	0,000															RuPd
0,248	0,179	0,236	0,151	0,188	0,094	0,000														RuTa
0,315	0,210	0,229	0,229	0,264	0,140	0,120	0,000													RuLi
0,349	0,144	0,329	0,240	0,363	0,336	0,245	0,298	0,000												LaKg
0,261	0,168	0,137	0,159	0,194	0,141	0,129	0,093	0,242	0,000											RuKu
0,253	0,178	0,142	0,160	0,206	0,101	0,127	0,077	0,242	0,025	0,000										RuVi
0,263	0,106	0,223	0,148	0,224	0,195	0,140	0,135	0,074	0,118	0,114	0,000									RuVd
0,405	0,289	0,222	0,283	0,306	0,197	0,183	0,141	0,346	0,051	0,038	0,180	0,000								PrPi
0,251	0,166	0,167	0,176	0,214	0,128	0,086	0,095	0,193	0,058	0,042	0,091	0,062	0,000							BaKs
0,309	0,216	0,229	0,152	0,240	0,054	0,080	0,127	0,244	0,107	0,071	0,136	0,117	0,053	0,000						BaKr
0,344	0,274	0,285	0,198	0,281	0,104	0,086	0,236	0,307	0,193	0,178	0,210	0,217	0,124	0,075	0,000					MaMn
0,353	0,283	0,305	0,175	0,266	0,097	0,111	0,202	0,393	0,216	0,208	0,263	0,291	0,219	0,137	0,107	0,000				FuMt
0,415	0,322	0,327	0,219	0,353	0,116	0,146	0,249	0,377	0,240	0,219	0,240	0,327	0,194	0,117	0,110	0,104	0,000			MaMt
0,291	0,376	0,399	0,280	0,200	0,286	0,220	0,426	0,516	0,380	0,381	0,361	0,501	0,353	0,297	0,247	0,226	0,332	0,000		TrKi
0,304	0,309	0,336	0,220	0,235	0,167	0,125	0,317	0,390	0,280	0,277	0,266	0,367	0,242	0,170	0,099	0,099	0,177	0,111	0,000	TrKi2

Lisa 7. Uuritud indiviidide populatsioonide geneetilise varieeruvuse näitajad kahe ITS andmete põhjal.

Liik	Populatsioon	N	P	Na	Np	Ho	He	F	
<i>Dactylorhiza russowii</i>	Palivere (RuPa)	14	100,00%	4,000	0,000	0,143	0,588	0,789	
	Kaasiku (RuKa)	17	100,00%	5,000	0,000	0,294	0,394	0,566	
	Keila (RuKe)	18	50,00%	3,500	0,500	0,333	0,339	0,016	
	Pikavere (RuPi)	10	50,00%	3,500	0,000	0,000	0,350	1,000	
	Põlva (RuPo)	13	100,00%	4,000	0,000	0,077	0,531	0,891	
	Päidlapalu (RuPd)	21	100,00%	3,500	0,000	0,167	0,342	0,264	
	Tatra (RuTa)	18	50,00%	3,000	0,000	0,278	0,338	0,178	
	Iide (RuIi)	14	50,00%	2,500	0,000	0,214	0,237	0,097	
	Kugalepa (RuKu)	17	50,00%	3,000	0,000	0,147	0,328	0,551	
	Viieristi (RuVi)	19	50,00%	2,000	0,000	0,132	0,319	0,588	
	Viidu (RuVd)	20	50,00%	4,000	1,000	0,050	0,361	0,862	
		Keskmine		68,18%	3,455	0,136	0,167	0,375	0,527
	<i>Dactylorhiza russowii x incarnata</i>	Põlva (RxIPo)	3	100,00%	2,500	0,000	0,000	0,583	1,000
		Päidlapalu (RxIPd)	6	100,00%	5,000	0,000	0,333	0,570	0,593
		Keskmine		100,00%	3,750	0,000	0,167	0,577	0,797
<i>Dactylorhiza russowii x baltica</i>	Põlva (RxBPo)	1	0,00%	1,000	0,000	0,000	0,000		
<i>Dactylorhiza russowii x maculata</i>	Matrosy (RxMMt)	2	0,00%	1,000	0,000	0,000	0,000		
<i>Dactylorhiza lapponica</i>	Kugalepa 1 (LaKg)	16	100,00%	3,500	0,000	0,031	0,351	0,484	
<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	Kitzbühel 1 (TrKi)	19	50,00%	2,500	0,000	0,000	0,241	1,000	
	Kitzbühel 2 (TrKi2)	11	100,00%	4,000	0,500	0,182	0,426	0,571	
		Keskmine		75,00%	3,250	0,250	0,091	0,333	0,785
<i>Dactylorhiza praetermissa</i>	Pilguse (PrPi)	16	100,00%	3,000	0,000	0,156	0,245	0,581	
<i>Dactylorhiza baltica</i>	Kuusnõmme (BaKs)	21	100,00%	4,000	0,000	0,048	0,399	0,903	
	Kaarmise (BaKr)	14	50,00%	4,000	0,000	0,250	0,375	0,333	
		Keskmine		75,00%	4,000	0,000	0,149	0,387	0,618
<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	Matrosy (FuMt)	11	100,00%	3,500	0,500	0,182	0,244	0,178	
<i>Dactylorhiza maculata</i>	Mandera (MaMn)	12	100,00%	3,500	0,000	0,375	0,519	0,397	
	Mandera (MaMt)	8	100,00%	2,500	0,000	0,125	0,391	0,667	
		Keskmine		100,00%	3,000	0,000	0,250	0,455	0,532

Lisa 8. Populatsioonide vahelised eristumise väärtused (Fst) kahe ITS andmete põhjal. Mida suurem on väärtus, seda kaugemad populatsioonid on omavahel. Mida väiksem on väärtus, seda lähedasemad on populatsioonid.

RuPa	RuKa	RuKe	RuPi	RuPo	RuPd	RuTa	RuLi	LaKg	RuKu	RuVi	RuVd	PrPi	BaKs	BaKr	MaMn	FuMt	MaMt	TrKi	TrKi2	
0,000																				RuPa
0,146	0,000																			RuKa
0,163	0,075	0,000																		RuKe
0,158	0,026	0,128	0,000																	RuPi
0,232	0,276	0,378	0,322	0,000																RuPo
0,174	0,022	0,080	0,016	0,302	0,000															RuPd
0,168	0,052	0,117	0,052	0,340	0,033	0,000														RuTa
0,203	0,110	0,177	0,153	0,394	0,088	0,040	0,000													RuLi
0,164	0,026	0,086	0,023	0,295	0,011	0,042	0,104	0,000												LaKg
0,179	0,059	0,166	0,073	0,330	0,035	0,089	0,208	0,020	0,000											RuKu
0,168	0,065	0,124	0,066	0,353	0,049	0,024	0,040	0,064	0,143	0,000										RuVi
0,160	0,036	0,111	0,023	0,330	0,027	0,037	0,102	0,040	0,103	0,023	0,000									RuVd
0,200	0,033	0,139	0,045	0,306	0,040	0,091	0,171	0,046	0,104	0,108	0,064	0,000								PrPi
0,124	0,048	0,155	0,070	0,240	0,064	0,113	0,184	0,068	0,127	0,128	0,090	0,026	0,000							BaKs
0,140	0,031	0,116	0,015	0,329	0,023	0,055	0,143	0,036	0,096	0,060	0,022	0,052	0,071	0,000						BaKr
0,116	0,075	0,109	0,077	0,222	0,075	0,055	0,064	0,088	0,117	0,046	0,057	0,114	0,092	0,075	0,000					MaMn
0,200	0,163	0,144	0,154	0,389	0,153	0,080	0,039	0,165	0,171	0,082	0,123	0,244	0,230	0,142	0,082	0,000				FuMt
0,203	0,202	0,195	0,201	0,339	0,201	0,121	0,071	0,212	0,227	0,121	0,166	0,285	0,244	0,189	0,071	0,030	0,000			MaMt
0,204	0,114	0,178	0,166	0,399	0,095	0,046	0,005	0,110	0,217	0,052	0,112	0,175	0,189	0,150	0,069	0,036	0,069	0,000		TrKi
0,160	0,182	0,179	0,187	0,299	0,186	0,125	0,094	0,194	0,208	0,122	0,156	0,252	0,210	0,176	0,059	0,046	0,027	0,089	0,000	TrKi2

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Jekaterina Aida,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose
Russowi sõrmkäpa (*Dactylorhiza russowii*) geneetiline varieeruvus ning liigi identiteet,

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 lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **20.05.2016**