

Afin de donner plus de consistance aux données apportées par Kaina Privet, toutes les séquences nucléotidiques ITS obtenues dans le laboratoire ECOBIO de Rennes (Ainouche A. et M., Guerin J.-C.) ont été alignées et comparées à toutes les séquences ITS disponibles dans les bases de données. Après élimination des séquences tronquées (comme [IndSL2](#) et [IndSL9](#)) ou affectées par des incertitudes, plusieurs conclusions ressortent :

1) [ApiKer1](#) (apifera de Kervégant) est une séquence ITS connue chez *O. apifera* (AY364887=AJ539529) et *O. aegirtica* (AM711763), et qui provient de l'introggression de la séquence *aegirtica* dans *O. apifera*.

2) Les séquences ITS [PassOC1](#) (Oléron les Courants), [PassOC2](#), [PassKer4](#), [IndSL6](#) (Indéterminé de Saint Loup), [IndPara2](#) (Indéterminé des Olonnes La Paracou), [Arf4](#) et [Arf3](#). sont totalement identiques. Elles correspondent totalement à la séquence ITS de référence pour la macroespèce *sphegodes*, présente chez de nombreux *Ophrys* (24 sur 47) : *sphegodes / aranifera* (AY699974= AY014542= AJ973255=AJ973254), *helenae*, *passionis*, *garganica*, *litigiosa / araneola* (AM711796), *incubacea*, *exaltata*, *spruneri*, *gortynia*, *lunulata*, *mammosa*, *aesculapii*, *morisii*, *splendida*, *promontorii*, *ferrum-equinum*, *argolica*, *biscutella*, *bertoloniiiformis*, *catalaunica* (AM711817), *reinholdii*, *cretica* , *cilicica* et *explanata*.

3) L'ITS [ArfLG2](#) (*sphegodes* La Grange) est une séquence ITS identique à celles des *Ophrys araneola / litigiosa* (AM711797), *cornuta* (AM711819) et *bertolonii* (AY014521). Il s'agit d'une séquence probablement introgressée dans *araneola*.

4) Enfin, les séquences ITS [Ara5](#), [Arf1](#), [Arf2](#), [ArfCH2](#), [ArfCH5](#), [ArfL4V2](#), [ArfLT3](#), [ArfSab2](#), [IndME5](#), [IndOL2](#) (indéterminé des Olonnes), [IndSL1](#), [IndSL3](#), [IndSL3c](#), [IndSL4](#), [IndSL8](#), [InsSL10](#), [PassKer6](#), identiques entre elles, sont identiques aux séquences des *Ophrys castellana*, *riojana* et *catalaunica* (AY699968). Est-ce que cela possède un sens ? probablement oui si l'on pense que *O. castellana* (*O. exaltata castellana*) est une forme d'*O. arachnitiformis* pour lequel, malheureusement nous ne disposons pas de séquence ITS.

Pour conclure sur cette séquence ITS :

- Nous disposons donc de différents échantillons correspondant à 4 types d'ITS connus.
- Plusieurs types de séquences peuvent être observés pour certaines références, ce qui suggère soit des introgressions chez certains *Ophrys*, soit des populations en cours de différenciation (pour ne pas dire spéciation) :
 - a. [IndPara2](#) (Indéterminé des Olonnes La Paracou) (ITS macroespèce [sphegodes / aranifera](#)) et [IndOL2](#) (indéterminé des Olonnes) (ITS [O. exaltata castellana](#)), [IndPara2](#) confirme la composante aranifera de l'*Ophrys* des Olonnes.
 - b. [IndSL6](#) (ITS macroespèce [sphegodes / aranifera](#)) différent de [IndSL1, 3, 3c, 4, 8, 10](#) (ITS [O. exaltata castellana](#)).
 - c. [PassKer4](#) (ITS macroespèce [sphegodes](#)) et [PassKer6](#) (ITS [O. castellana](#)),
 - d. [Arf3,4](#) (ITS macroespèce [sphegodes](#)) et [Arf1,2](#) (ITS [O. castellana](#)).

Notons que les séquences [ArfLAV2](#) (Les 4 vents), [ArfLT3](#) (La Tresson), et [ArfSab2](#) (Les Sableaux), correspondent à des *O.* de Saint-Loup ([IndSL](#)) dont il a été dit qu'ils montraient une possible transition vers l'*Ophrys* des Olonnes ([IndOL](#)).

Malgré de trop nombreuses incertitudes chez la plupart des séquences nucléaires BGP présentes dans les banques de données, mais avec des séquences BGP de très bonne qualité obtenues par Kaina, il est possible de noter les rares points suivants :

- Les séquences BGP des *Ophrys passionis* et *morisii* et celles des [ArfCH2](#), [IndOL5](#), [IndSL4](#), [IndSL10](#), sont identiques.
- Les séquences [ArfLT3](#) (La Tresson), [IndSL3](#) (Saint Loup) et [PassKer4](#) sont identiques. Le génome nucléaire de [PassKer4](#) n'associe pas la même séquence nucléaire ITS que celle des [ArfLT3](#) et [IndSL3](#) à la séquence BGP. Ceci constitue une preuve directe du fait que des introgressions ont eu lieu

durant l'histoire évolutive de ces Orchidées très précoces de la façade atlantique.

Yves HENRY 13/01/2017

Je n'étais pas pleinement satisfait des conclusions fragmentaires précédemment données sur les résultats de Kaina, et pour amener une plus grande consistance à ses données, j'ai repris toutes les séquences ITS qu'elle a obtenues. Par ailleurs, depuis un moment je travaillais sur les séquences ITS des *Ophrys* et leurs introgressions. Tout cela va de pair.

J'ai donc réalisé un arbre de relation, c'est à dire un arbre (ci-joint) qui regroupe les séquences les plus ressemblantes, avec toutes les séquences de Kaina, et j'ai regardé à quoi ces ITS correspondaient :

1) ApiKer1 est une séquence ITS connue chez *O. apifera* (AY364887=AJ539529) et *O. aegirtica* (AM711763), et qui provient de l'introgression de la séquence *aegirtica* dans *O. apifera*.

2) IndSL9, très tronquée en aval, le reste étant identique à *O. bicornis* AM039522, mais c'est très incertain, ce peut être plein de choses.

3) IndSL2, très tronquée en aval (même manques que IndSL9), le reste est identique à *O. incubacea* (AM711785), avec la même incertitude que le précédent.

4) Pour les séquences PassOC1, PassOC2, PassKer4, IndSL6, IndPara2, Arf4 et Arf3. Arf4 possède une incertitude (un R). Toutes les autres séquences sont identiques entre elles, il s'agit de la séquence ITS de référence pour la macroespèce *sphegodes* et qui est présente chez les *Ophrys sphegodes* / *aranifera* (AY699974=AY014542=AJ973255=AJ973254), *helenae* (AY014514), *passionis* (AY699949), *garganica* (AM711834=AY014532), *litigiosa* / *araneola* (AM711796=AY014516), *incubacea* (AM711783=AY699975), *exaltata* (AM711827), *spruneri* (AY014544), *gortynia* (AM711837), *lunulata* (AM711712), *mammosa* (AY014537), *aesculapii* (AM711787), *morisii* (AM711720), *splendida* (AY014543), *Ophrys promontorii* (AY014538), *ferrum-equinum* (AY014529=AM711829), *argolica* (AY014517), *biscutella* (AM711809), *bertoloniiformis* (AY014522=AM711806), *catalaunica* (AM711817) et *explanata* (AM711828). Il est intéressant de noter que les séquences ITS des *Ophrys* de l'ensemble *sphegodes* (la

macroespèce) ont accumulé très très peu de mutations (1 au plus chez les 37 taxons), ce qui suggère qu'ils soient relativement récents.

5) Ara2 est une séquence ITS qui n'est identique à aucune autre. Il y a une incertitude sur le nucléotide 5 qui est affublé d'un R (ça signifie que le nucléotide est un A ou un G). Si c'est un G, Ara2 est identique à *araneola / litigiosa* (AM711797), voir le point 6), et si c'est un A, Ara2 est identique aux PassOC1, PassKer4, IndSL6, IndPara2, Arf4, et IndOLYW1 vus en 4), c'est-à-dire à la séquence ITS de référence pour la macroespèce sphegodes.

6) L'ITS ArfLG2 est une séquence ITS identique à celles des *Ophrys araneola / litigiosa* (AM711797), *cornuta* (AM711819) et *bertolonii* (AY014521). Il s'agit d'une séquence probablement introgressée dans *araneola* par *bertolonii*.

7) La séquence ITS PassKer2 est tronquée en amont, ce qui la rend identique aux ITS de plusieurs *Ophrys*, sans qu'il soit possible de déterminer lequel :

```
PassKer2      -----  
ATTTGACAACCTTGTGAACTAATTCAGCAGCTTGCTAA  
ArfLG2  
CCCTGCAGAGAACGATTGACAACCTTGTGAACTAATTCAGCAGCTTGCTAA
```

8) La séquence ArfSab3 est particulière en ce sens qu'elle possède un nucléotide additionnel (A) en position 36 de mon alignement, ce que je n'ai observé chez aucun des *Ophrys* pour lesquels une séquence ITS est disponible. Probable problème de séquençage.

9) La séquence IndOLYW1 présente une incertitude (indiquée par un R), si ce R est en fait un G, ce sera une séquence comme les 11), et si R est un A ce sera une séquence comme dans le point 4).

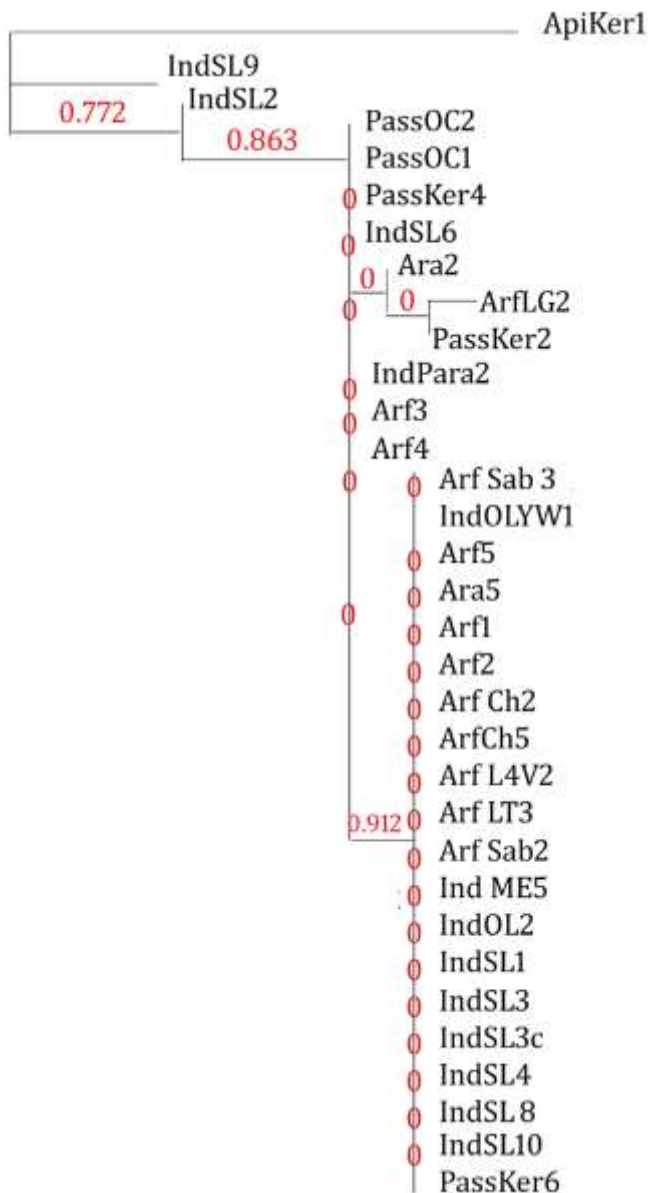
10) La séquence Arf5 avec 2 G additionnels et un CC additionnel ne correspond à rien de connu. Probablement un problème de séquençage.

11) Enfin, les séquences Ara5, Arf1, Arf2, ArfCH2, ArfCH5, ArfLAV2, ArfLT3, ArfSab2, IndME5, IndOL2, IndSL1, IndSL3, IndSL3c, IndSL4, IndSL8, IndSL10, PassKer6 sont toutes identiques entre elles. De plus elles sont identiques aux séquences des *Ophrys castellana* (AY699951), *riojana* (AY699967) et *catalaunica* (AY699968). Est-ce que cela possède un sens ? probablement oui si l'on pense que *O. castellana* (*O. exaltata castellana*) est une forme d'*O. arachnitiformis* (taxon très précoce dans le sud-est). Malheureusement il n'y a pas de séquence ITS identifiée chez *arachnitiformis* (il y en a une chez *exaltata* qui se trouve être la séquence de référence de la macroespèce sphegodes)..

Pour conclure :

- Nous disposons donc de différents échantillons correspondant au moins à 4 types d'ITS déjà connus.
- Il est intéressant de constater que plusieurs types de séquences peuvent être observés pour certaines références, ce qui suggère soit des introgressions chez certains *Ophrys*, soit des populations en cours de différenciation (pour ne pas dire spéciation) :

IndSL6 (macroespèce sphegodes) différent de IndSL1, 3, 3c, 4, 8, 10 (*O. castellana*), de même pour des Pass (PassKer4 (macroespèce sphegodes) et PassKer6 (*O. castellana*)), des Arf (Arf3,4 (macroespèce sphegodes et Arf1,2 *O. castellana*)).



Yves HENRY 2016

Vous trouverez ci-dessous quelques remarques concernant les séquences nucléaires **ITS** (pour ITS1 - 5.8S rRNA – ITS2) et **BGP**, et la séquence chloroplastique **psbA-trnH**, séquences obtenues dans votre laboratoire par Kaïna, en focalisant essentiellement sur l'Ophrys des Olonnes (IndOL) et l'Ophrys de Saint Loup (IndSL). ITS :

Curieusement, les séquences ITS « IndME5 » et « IndOL2 » se révèlent identiques à la séquence ITS AY699951 de l'Ophrys exaltata castellana, Ophrys qui ne s'observe qu'en Espagne. Cependant, ITS AY699951 est également identique à l'une des séquences ITS de l'Ophrys catalaunica : AY699968. Une seule différence nucléotidique avec O. passionis.

Egalement curieux est le fait que la séquence ITS « IndSL9 » est identique à la séquence ITS AM039522 de l'Ophrys bicornis (un Ophrys observé dans les Balkans). La séquence la plus proche est celle d'O. garganica AM711834, qui ne diffère que par un seul nucléotide.

Pas d'explication claire, mais probablement des mutations dans les séquences de passionis et de garganica. La séquence ITS « Ind SL2 » est identique à l'une des séquences ITS d'Ophrys incubacea AM711785. Enfin, la séquence ITS « IndOLYW1 » est identique à tout un ensemble de séquences ITS identiques, caractéristiques de la macroespèce sphegodes : Ophrys sphegodes / aranifera (AY699974=AY014542=AJ973255=AJ973254), helenae (AY014514), passionis (AY699949), garganica (AM711833=AM711834=AY014532), litigiosa / araneola (AM711796=AY014516), incubacea (AM711783=AY699975), exaltata (AM711827), spruneri (AY014544), gortynia (AM711837), lunulata (AM711712), mammosa (AY014537), aesculapii (AM711787), morisii (AM711720), splendida (AY014543), Ophrys promontorii (AY014538), Ophrys ferrum-equinum (AY014529=AM711829), Ophrys argolica (AY014517), Ophrys biscutella (AM711809).

Le fait que les séquences ITS des Ophrys des Olonnes « IndOL2 » et « IndOLYW1 » soient différentes suggère que l'Ophrys des Olonnes puisse être un taxon hétérogène. Il en va de même pour les deux Ophrys de Saint Loup (« IndSL9 » et « Ind SL2 »).

BGP : La séquence BGP (beta-galactosidase-like protein) pose d'autres types de questions, du seul fait que les séquences déposées dans les banques présentent un nombre plus ou moins important d'incertitudes quant à certains nucléotides. Malgré cela, nous avons pu noter que les séquences BGP « IndOL5 », « IndOL10 », « IndOLYW1 », « IndSL4 », « IndSL10 », « PassKer6 » étaient identiques à la séquence BGP de l'Ophrys morisii. - « IndOL4 » est proche d'O. arachnitiformis (une seule différence) et donc est très distant de morisii et de passionis. - « IndSL1 » présente une seule différence nucléotidique avec l'O. morisii, et 1 différence (la même que celle observée avec morisii) et 5 incertitudes avec passionis. Par contre « IndSL3 » et « PassKer4 » ne diffèrent de morisii que par un seul gap.

Les alignements permettent de noter que morisii ne diffère de passionis que par quatre incertitudes. Ces incertitudes nuisent fortement aux conclusions, car elles ne permettent pas d'être certain que les séquences morisii et passionis sont identiques. Notons au passage que la plupart des nouvelles séquences utilisées par Breitenkopf et al. (2015) : CAD, FAD, BGP, LACS et Leafy présentent des incertitudes en nombre variable (jusqu'à 15 pour CAD morisii). La séquence MYB est identique chez passionis et morisii, mais elle ne comprend que 144 nucléotides. Ici encore, nous pouvons noter que les Ophrys des Olonnes (« IndOL4 », « IndOL5 », « IndOL10 », « IndOLYW1 ») et les Ophrys de Saint Loup (« IndSL1 », « IndSL3 », « IndSL4 », « IndSL10 ») échantillonnés ne sont pas homogènes, confirmant ainsi l'observation effectuée avec les séquences ITS. Il est donc clair que ces deux taxons possèdent une origine plus complexe que celle suspectée. Nous ne disposons pas, actuellement, de séquences nucléaires capables de discriminer passionis et morisii. Si passionis et morisii (Corse) correspondent à la même espèce, les Ophrys des Olonnes sont pour certains apparentés à passionis. Il sera nécessaire de séquencer les BGP de ces deux taxons (ou un autre gène nucléaire), pour avoir une certitude. De même, il sera nécessaire de séquencer la totalité des 1600 nucléotides de la séquence psbA-trnH (en fait la seconde partie) de passionis et des Ophrys des Olonnes et de Saint Loup pour déterminer le parent maternel. PsbA-trnH : Les séquences chloroplastiques psbA-trnH obtenues sont sensiblement plus courtes (la moitié ou moins) que les séquences présentes dans les bases de données. Ceci limite la caractérisation des séquences obtenues. En effet, la plupart des insertions ou délétions de courtes séquences (qui permettent de caractériser les différentes

macroespèces) se rencontrent dans la moitié manquante. Cependant, la première moitié permet de différencier *sphegodes* et *araneola*.

La plus grande partie des séquences *psbA-trnH* obtenues par Kaina sont identiques à la séquence *araneola* (Ara1, Ara5, ArfCH2, ArfCH5, ArfLG2, IndL4V2, IndLT3, IndOL2, IndOL6, IndOL8, IndOLYW1, IndSL1, IndSL3, IndPara2, IndSab2, IndSab3, PassKer2, PassKer4, PassKer6). Il n'y avait pas de séquence chloroplastique connue chez *passionis* avant les données de Kaina. Il est donc vraisemblable que Kaina ait, d'une part identifié en partie la séquence *passionis* avec PassKer2, PassKer4, PassKer6 (peut-être faut-il déposer cette séquence partielle dans GenBank ??) , et d'autre part montré l'identité *araneola-passionis* pour la partie de séquence *passionis* caractérisée. C'est intéressant puisque l'analyse des séquences chloroplastiques *psbA-trnH* du très large complexe *aranifera* montre que cet ensemble peut se décliner en deux clades : - *O. aranifera*, *O. aveyronensis*, *O. splendida* et *O. morisii* possédant un même haplotype chloroplastique, caractérisé en fait par une insertion CTATTATAT.

- les *O. ferrum-equinum*, *cornuta*, *lunulata*, *reinholdii*, *mammosa*, *incubacea*, *araneola*, *gortynia*, *panormitana*, *exaltata* et *garganica* s'en séparent assez nettement. Les séquences PassKer6, PassKer2, PassKer4, « IndOL2 », « IndOL6 », « IndOL8 », « IndOLYW1 » IndL4V2, IndLT3, et « IndSL1 », IndSL3, IndSab2, IndSab3, correspondent à cet ensemble. Ceci montre qu'une large partie des *Ophrys* des Olonnes et les *Ophrys* de Saint Loup possèdent le cytoplasme de ce clade. Les autres séquences *psbA-trnH* déterminées par Kaina (ApiKer1, IndME1, IndME3, IndME4, IndME5, PassOC2, IndOL4, IndOFM3, Arf1, Arf2, Arf3, Arf5), se répartissent en deux ensembles : celui présentant une insertion ATTTATAGCT (Arf1, Arf2, Arf3, Arf5) observable dans les ensembles *fuciflora/scolopax* et les *Ophrys aveyronensis*, *splendida*, *morisii* et *sphegodes*. Pour les autres (ApiKer1, IndME1, IndME3, IndME4, IndME5, PassOC2, IndOL4, IndOFM3), seule la séquence ApiKer1 avec sa délétion CACTAGAAAAA caractéristique de l'*Ophrys apifera* est à coup sur une séquence *psbA-trnH* *apifera* qui paraît incomplète. L'obtention de séquences complètes permettra de déterminer si certaines de ces séquences *psbA-trnH* restantes appartiennent à d'autres macroespèces.

Pour conclure brièvement sur le travail de Kaina, les séquences obtenues indiquent, pour les données ITS, BGP et *psbA-trnH*, que les *Ophrys* des Olonnes et *Ophrys* de Saint-Loup sont des entités hétérogènes, susceptibles de

présenter, chacune, au moins deux types de séquences ITS, BGP et pour le seul *Ophrys* des Olonnes *psbA-trnH*. Par ailleurs, nous pouvons noter qu'il s'est avéré très difficile de séparer *Ophrys morisii* et *Ophrys passionis* pour les séquences nucléaires ITS et BGP. C'était attendu pour les ITS, mais cela reste lié aux incertitudes concernant les séquences BGP (surtout présentes chez *O. morisii*). A l'inverse, la séquence chloroplastique *psbA-trnH* de l'*O. morisii* (clade *sphegodes*) apparaît différente de celle (partielle) déterminée par Kaina pour l'*O. passionis* (clade *araneola*).