

Bonjour,

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 Breitkopf *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 *sphogodes* 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 *sphogodes*. 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-trbH, 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 lenseul *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 *sphogodes*) apparaît différente de celle (partielle) déterminée par Kaina pour l'*O. passionis* (clade *araneola*).