

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA  
ZAGOTAVLJANJE REPRODUKTIVNEGA USPEHA IN  
PRERAZPOREJANJE ZALOG PRI ILIRSKI PERUNIKI  
(*IRIS ILLYRICA*, IRIDACEAE)

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Zagotavljanje reproduktivnega uspeha in prerazporejanje  
zalog pri ilirski peruniki (*Iris illyrica*, Iridaceae)**

(Ensuring reproductive success and sex allocation in Illyrian iris (*Iris illyrica*,  
Iridaceae))

Ime in priimek: Manja Tišler  
Študijski program: Biodiverziteteta  
Mentor: doc. dr. Boštjan Surina

Koper, september 2017

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Manja TIŠLER

Naslov zaključne naloge:

Zagotavljanje reproduktivnega uspeha in prerazporejanje zalog pri ilirski peruniki (*Iris illyrica*, Iridaceae)

Kraj: Koper

Leto: 2017

Število listov: 27

Število slik: 7

Število tabel: 6

Število referenc: 45

Mentor: doc. dr. Boštjan Surina

Ključne besede: Iridaceae, *Iris illyrica*, prerazporejanje zalog, P/O razmerje, reproduktivna biologija

Izvleček: Reproductivni sistemi pri rastlinah predstavljajo izjemno kompleksen in zanimiv fenomen s katerim so se ukvarjali že številni raziskovalci. Poleg Camerarius in Kölreuterja je Christian Konrad Sprengel dodobra opisal opráševanje rastlin. Glede perunika (rod *Iris* L., Iridaceae) je že takrat spoznal, da je za njihovo uspešno spolno razmnoževanje potreben vektor za prenos peloda. Domala 80 % vseh poznanih kritosemenk je hermafroditskih, tej skupini pa pripada tudi ilirska perunika (*Iris illyrica*). V okviru zaključne naloge smo skušali določiti: (a) reprodukcijski sistem ilirske perunike, posredno s pomočjo ugotavljanja razmerja med številom pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O razmerje); (b) najti morebitne razlike v P/O razmerju glede na pozicije cveta med populacijama s Kraškega roba in iz Liburnijskega krasa ter razlike znotraj populacij; (c) ugotoviti morebitne razlike v reprodukcijskem uspehu – produkciji semen glede na pozicijo cvetov ter njihov redosled cvetenja na dveh populacijah, in sicer na Kraškem robu ter Liburnijskem krasu. Glede na rezultate P/O razmerja se ilirska perunika razmnožuje fakultativno avtogamno, kar pa ni skladno z navedbami v literaturi. P/O razmerje se, ozirajoč na pozicijo cvetov, ni statistično razlikovalo glede na pozicijo in redosled cvetenja cvetov oziroma lokacijo. Prav tako nismo našli nobenih statističnih razlik pri primerjavi števila semen po plodovih, ozirajoč se na pozicijo cvetov med proučevanima populacijama. Sklepamo, da ilirska perunika enakomerno razporeja zaloge med moško in žensko funkcijo glede pozicije cvetov, znotraj posamezne populacije in med obema populacijama.

### Key words documentation

Name and SURNAME: Manja TIŠLER

Title of the final project paper:

Ensuring reproductive success and sex allocation in Illyrian iris (*Iris illyrica*, Iridaceae)

Place: Koper

Year: 2017

Number of pages: 27

Number of figures: 7

Number of tables: 6

Number of references: 45

Mentor: Assist. Prof. Boštjan Surina, PhD

Keywords: Iridaceae, *Iris illyrica*, sex allocation, P/O ratio

Abstract: Reproductive systems in plants represent a complex and interesting phenomena with which a lot of scientists have dealt. In addition of Camerarius and Kölreuter, Christian Konrad Sprengel did thoroughly describe the pollination of plants. On irises (g. *Iris* L., Iridaceae) he recognized that, for their successful and efficient sexual breeding, they require a vector for the transmission of pollen. Almost all of the 80 % of angiosperms are hermaphroditic, including Illyrian iris (*Iris illyrica*). In our study we were trying to specify (a) what kind of a reproductive system has an Illyrian iris indirectly with finding out the ratio of pollen grains and ovules (P/O ratio), (b) figure out the differences in P/O ratio with respect to flower position between populations of the Karst edge and the Liburnian karst, and the difference within each population (c) figure out if there is any difference in reproductive success – in the production of seeds depending on the position of the flowers and their flowering order in the two populations, namely on the Karst edge and Liburnian karst. According to the P/O ratio results *Iris illyrica* has a facultative autogamous breeding system which is not congruent with the existing literature. P/O ratio had no statistical difference in the flowering positions and their flowering order or on the locations. We also found no statistical differences when comparing the number of seeds per fruit set with respect to flower positions between studied populations. Thus, we can conclude based on the results, that the ratio of resource allocation between male and female function is similar, on every position, in and between two populations.

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Boštjanu Surini za sprejetje mentorstva in usmerjanje pri pisanju zaključne naloge.

Prav tako bi se neizmerno zahvalila dr. Živi Fišer Pečnikar in dr. Alenki Baruca Arbeiter za pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela ter vso spodbudo in usmerjanje pri nastajanju zaključne naloge ter dr. Petru Glasnoviću za njegovo pomoč pri izdelavi MTB mreže razširjenosti ilirske perunike v Sloveniji.

Navsezadnje bi se zahvalila vsem, ki so mi potrpežljivo stali ob strani in s svojo nesebično pomočjo pripomogli k nastanku zaključne naloge.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Evolucija biologije oprasovanja pri kritosemenkah.....	2
1.1.1	Razvoj reprodukcijskih sistemov .....	2
1.2	Reprodukcijski sistemi.....	3
1.2.1	Zgodovina.....	3
1.2.2	Pregled reprodukcijskih sistemov.....	4
1.2.3	Razmerje pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O razmerje) .....	5
1.2.4	Prerazporejanje zalog (alokacija resursov).....	6
1.3	Ilirska perunika ( <i>Iris illyrica</i> L.) .....	6
1.3.1	Raznolikost perunik.....	6
1.3.2	Opis reproduktivne regije .....	7
1.3.3	Etnobotanični vidik perunike.....	9
2	MATERIALI IN METODE .....	10
2.1	Opis območja raziskave .....	10
2.2	Terensko delo.....	10
2.3	Laboratorijsko delo .....	10
2.3.1	Priprava vzorca.....	10
2.3.2	Štetje pelodnih zrn z elektronskim števcem delcev (Coulter Counter) .....	11
2.3.3	Štetje pelodnih zrn s hemocitometrom .....	11
2.3.3	Štetje jajčnih celic.....	12
2.3.4	Štetje semen.....	13
2.4	Statistična obdelava podatkov .....	13
3	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	14
3.1	Pelodna zrna in jajčne celice v odvisnosti od pozicij .....	14
3.2	Pozicije v odvisnosti od P/O razmerja .....	17
3.3	Plodovi v odvisnosti od lokacije in pozicij .....	21
4	ZAKLJUČEK .....	23
5	LITERATURA IN VIRI.....	24

## KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1:</i> Reprodukcijski sistemi rastline glede na log P/O (povzeto po Cruden 1977) .....	6
<i>Preglednica 2:</i> Število pelodnih zrn in jajčnih celic (ločeno s poševnico '/') glede na pozicijo na lokacijah Podpeč (Z2 Coulter Counter) in Zebar (hemocitometer), s podanim povprečjem, standardnim odklonom (SD) ter minimumom in maksimumom.....	14
<i>Preglednica 3:</i> Primerjava števila pelodnih zrn in jajčnih celic po pozicijah cvetov med seboj in znotraj samih pozicij, z enosmernim testom analize variance (ANOVA). Podana imamo vira variabilnosti, vsoto kvadratov (SS), stopnje prostosti (Df), srednji kvadrat (MS), varianco med pozicijami (F) in mejno vrednost (p).....	15
<i>Preglednica 4:</i> Prikaz logaritmirane vrednosti razmerja med pelodnimi zrn in jajčnimi celicami (P/O razmerje) glede na pozicijo cveta in rastline na lokacijah Podpeč in Zebar. Prav tako je prikazana mediana, povprečje, standardna deviacija ter minimum in maksimum. ....	17
<i>Preglednica 5:</i> Primerjava razmerja P/O med pozicijami z ANOVO na lokacijah Podpeč in Zebar. Podan imamo vir variabilnosti, vsoto kvadratov (SS), stopnje prostosti (Df), srednji kvadrat (MS), varianco med pozicijami (F) in mejno vrednost (p).....	19
<i>Preglednica 6:</i> Primerjava števila semen med pozicijami cvetov z ANOVO na lokacijah Podpeč in Zebar. Podan imamo vir variabilnosti, vsoto kvadratov (SS), stopnje prostosti (Df), srednji kvadrat (MS), varianco med pozicijami (F) in mejno vrednost (p).....	21

## KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

<i>Slika 1:</i> MTB mreža razširjenosti ilirske perunike v Sloveniji po kvadrantih srednjeevropskega kartiranja (vir podatkov: Bioportal.si, z dovoljenjem). Karta je ustrezno popravljena in dopolnjena z lastnimi podatki. En kvadrant obsega približno 35 kvadratnih kilometrov.....	7
<i>Slika 2:</i> Slika (levo) shematično prikazuje časovno razporeditev posameznih cvetov. Na najvišji poziciji se cvet odpre prvi, nato na zadnji poziciji (3) in na srednji poziciji (2). Slika (desno) prikazuje cvet <i>Iris illyrica</i> , v ospredju je vidna ena funkcionalna enota (shematski prikaz prirejen po Szöllösi in sod. 2010).....	8
<i>Slika 3:</i> Primer štetja pelodnih zrn pod hemocitometrom. Zaradi diluenta so pelodna zrna nabrekla. Posledično lahko vidimo odstop ovojnice (tektum eksine) od pelodnega zrna...	12
<i>Slika 4:</i> Jajčne celice vrste <i>Iris illyrica</i> vidne pod stereomikroskopom .....	13
<i>Slika 5:</i> Število pelodnih zrn in jajčnih celic glede na pozicije cvetov pri ilirski peruniki na lokacijah Podpeč (zgoraj) in Zebbar (spodaj).....	16
<i>Slika 6:</i> Povezanost med spremenljivkama peloda in jajčnih celic na razsevnem grafikonu .....	20
<i>Slika 7:</i> Primerjava števila semen po plodovih glede na pozicijo med primerki populacij iz Podpeči in Zebri. ....	22



## **SLOVAR**

**Apomíksa:** nespolno razmnoževanje, pri katerem se rastlina lahko razvije iz embria, nastalega iz različnih delov semenske zasnove, iz vegetativnih organov ali iz somatskih celic.

**Avtogamíja (sámooplodítev):** spolno razmnoževanje, pri katerem se združita gameti, ki izvirata od osebkov istega genotipa.

**Geitonogamíja:** samoopraševanje, pri katerem se pelod enega cveta prenese na brazdo pestiča drugega cveta pri istem osebku.

**Ksenogamíja (navzkřížno oprašévánje):** opraševanje, pri katerem se pelod enega osebka prenese na brazdo pestiča drugega osebka.

## 1 UVOD

Zametke preučevanja biologije in ekologije opraševanja pri rastlinah lahko zasledimo že v sedemnajstem in osemnajstem stoletju, za začetnika pa velja Christian Konrad Sprengel (1750 – 1816), ki je dodobra opisal opraševanje rastlin. Njegovih idej tedanji naravoslovci niso odobraval, čeprav so pozneje navdihnile samega Darwina (1862), ki jih je uporabil pri svojih opazovanjih in v znamenitem delu o opraševanju orhidej. Rezultati njegovih raziskav so nakazovali, da rastline, v splošnem, kot reprodukcijsko strategijo preferirajo navzkrižno opraševanje (= alogamija, ksenogamija) in ne samoopraševanja (= avtogamija, vključujoč geitonogamijo; Darwin 1862; Lloyd in Barrett 1996; Briggs in Walters 2016). Razlog za to preferenco je najbrž genetska korist v dolgoročnem smislu, ki vzdržuje ali povečuje delež heterozigotnosti v neki populaciji in posledično izboljšuje zmožnosti adaptacije na spreminjajoči se habitat posameznega taksona<sup>1</sup>. Na ta način se populacija lažje izogne naravnim mutacijam v genetskem materialu, ki so posledice parjenja ožjega sorodstva (*breeding depression* angl.; Willmer 2011).

Ilirska perunika (*Iris illyrica*) ima dvospolne (hermafroditске) cvetove, tako kot 80 % vseh poznanih kritosemenk, katerih cvetovi opravljajo moško in žensko vlogo (Willmer 2011). V povprečju imajo primerki ilirske perunike po tri cvetove na stebelu, ki se razlikujejo glede na pozicijo in časovno dinamiko cvetenja. Vsak cvet je sestavljen iz treh funkcionalnih enot, ki med seboj niso povezane.

V okviru zaključne naloge smo skušali ugotoviti, če se reprodukcijski uspeh glede na pozicijo cveta spreminja, oziroma, kakšen reprodukcijski sistem so ubrale ilirske perunike preko ugotavljanja razmerja med številom pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O razmerje) po posameznih cvetovih. Primerjali smo dve populaciji, in sicer populacijo na Kraškem robu (lokacija Podpeč, Slovenija) in Liburnijskem krasu (lokacija Zebar, Hrvaška).

---

<sup>1</sup> Habitat taksona zato, ker se le-ta prilagaja tako na abiotske kot biotske komponente v nekem ekosistemu. Poleg stohastičnih dogodkov je, kar se tiče opraševanja, pomembno všteti tudi pritisk herbivorov, obrambe pred paraziti, raznimi boleznimi itd., čemur se mora rastlina prilagajati.

## 1.1 Evolucija biologije opraševanja pri kritosemenkah

Prve kritosemenke naj bi se pojavile na območju nekdanje Gondvane pred približno 80 oz. 90 milijoni let, v obdobju srednje krede, ko je prevladovala suha klima. Kritosemenke so postale dominantne tudi v zmernem in tropskem podnebju (Raven in Johnson 2002). Pozitivna korelacija med njihovo izobilnostjo je pomenila tudi razvoj in speciacijo mnogih vrst opraševalcev, npr. metuljev (Lepidoptera) in muh (Diptera; Raven in Johnson 2002). Tekom evolucije so bile cvetnice vse bolj odvisne od opraševalcev in obratno, saj je za optimalno uspešnost oprašitve potreben učinkovit opraševalec in slednjemu tudi »prijazna« rastlina (Whitehouse 1950).

Zaradi naravne selekcije se venčni listi fenotipsko razvijajo v smeri bolj optimalnega reprodukcijskega uspeha, saj z velikim naborom prilagoditev (npr. barva, velikost, vonj cvetov, velikost same rastline idr.) privabljajo raznolike in različno učinkovite opraševalce. Tudi simetrija cveta predstavlja prilagoditev na opraševalce. Polisimetrični cvetovi (= zvezdasto somerni) so v primerjavi z monosimetričnimi cvetovi (cvetovi z eno ravnino simetrije) evolucijsko izvirnejši in pogostejši med cvetnicami prav zaradi koevolucije z njihovimi obiskovalci. Bilateralno simetrični cvetovi so se tekom evolucije razvili večkrat in neodvisno (Raven in Johnson 2002), deloma zato, ker je tranzicija iz radialnosti v bilateralnost lahko prehodna, kontrolira pa jo gen *cyc* (*cycloidea*). A to ne pomeni, da je bilateralnost cvetov vedno izpeljano stanje, saj evolucija ni enosmerni proces (Coen in Nugent 1994).

Westerkamp in Claßen-Bockhoff (2007) sta perunikovke (družina Iridaceae) uvrstila v skupino bilateralno simetričnih cvetov, za katere je najbolj značilno opraševanje s čebelami.

### 1.1.1 Razvoj reprodukcijskih sistemov

Različne reprodukcijske sisteme lahko zasledimo že zelo zgodaj v evoluciji kritosemenk (Pandey 1977), vendar reprodukcijski sistem prvih rastlin še ni znan. Whitehouse (1950) glede na razširjenost avto-inkompatibilnih vrst sklepa, da naj bi se pojavile sredi krede v teku adaptivne radiacije, ne zaradi preprečitve napada pred opraševalci ali osušitve, temveč zaradi zaščite semenskih zasnov (in brazd) pred pelodom drugih vrst in avtogamijo. Avto-inkompatibilnost je prisotna pri polovici vseh vrst kritosemenk in predstavlja enega od pomembnejših načinov bojevanja cvetnic pred že zgoraj omenjenimi posledicami parjenja ožjega sorodstva (*breeding depression* angl.) (Barrett 2013). Glede na današnjo adaptacijo avtogamnih vrst je možno, da se jih je večina razvila iz alogamnih prednikov (Whitehouse 1950).

## 1.2 Reprodukcijski sistemi

### 1.2.1 Zgodovina

Skozi zgodovino sta se estetika in funkcija rastlin smatrali kot nekaj, kar je bilo dano človeku ali imelo pomen samo po sebi. Zavedali so se, da obstaja nek odnos med rastlinami in žuželkami (že Aristotel), čeprav je niso povezali z oprашevanjem. Še v 17. in 18. stoletju so mislili, da žuželke obiskujejo rastline naključno, glavno je le, da *farina fecundens* (= pelod) pristane na brazdi. Izjeme so bili Babilonci, ki so se zavedali pomembnosti reprodukcije smokvovcev ter stari Egipčani, ki so ročno opráševali dateljnovne palme (Lloyd in Barrett 1996).

Po navedbah Lloyda in Barretta (1996) se je že Linne zavedal reprodukcijske vloge rastlin in prepoznal nektarje, a temu ni pridajal večjega pomena, posebej ne v rastlinski sistematiki.

Poleg Camerariususa (1694) in Kölreuterja (1761) se je preučevanje reproduktivnih funkcij pri rastlinah pričelo pred približno 200 leti, natančneje z izdajo knjige »*Das entdeckte Geheimniss der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen*« (Sprengel 1793), kjer je opisal vlogo cveta, ki vodi žuželke do nektarjev<sup>2</sup>. Pri preučevanju perunik je leta 1789 spoznal, da nekatere vrste obvezno potrebujejo opráševalca za uspešen nastanek plodov<sup>3</sup>. Sprengel je poznal delo Kölreuterja (Lloyd in Barrett 1996), ki je ugotovil pomembnost opráševanja z opráševalci pri dvodomnih rastlinah. Preko perunik in drugih vrst je spoznal, da bi upad opráševalcev posledično povzročil tudi upad rastlinskih vrst (Kölreuter 1761).

Šele približno 70 let pozneje je, na pobudo Roberta Browna, postalo delo Sprengla priznано in pomembno za Darwina, ki je zaključil, da je avtogamija slabša strategija za potomstvo kot ksenogamija (Lloyd in Barrett 1996). Darwin je, za razliko od Sprengla, ugotovil, da je navzkrižno opráševanje pri rastlinah primarna prilagoditev (Briggs in Walters 2016) in v njegovem delu o razmnoževanju orhidej (1862) na začetku zapisal, da

---

<sup>2</sup> »Denn ich fahe, daß diejenigen Blumen, deren Krone an Einer Stelle anders gefärbt ift, als sie überhaupt ift, diefe Flecken, Figuren, Linien oder Düpfel von befonderer Farbe immer da haben, wo fich der Eingang zum Saffhalter befindet.« (str. 13)

<sup>3</sup> »Aber ich fand noch mehr, nemlich daß diefe Blumen schlechterdings nicht anders befruchtet werden können, als durch Infekten.« (str. 13-14)

je potreba po križanju med osebki univerzalni zakon narave<sup>4</sup>.

Šele s pričetkom genetike se je začelo nadgrajevanje znanja o križanju in vzpostavitvi avto-inkompatibilnih mehanizmov (Gibbs 2014). Med prvimi začetniki so Correns (1913) na vrsti *Cardamine pratensis* ter East in Mangelsdorf (1925), ki sta z eksperimenti na tobaku (rod *Nicotiana*) opazovala avto-inkompatibilnost vrste.

## 1.2.2 Pregled reprodukcijskih sistemov

Okoli 90 % kritosemenk se biotsko oprašuje (Barrett in Hough 2013), zato je prispetje peloda na brazdo pestiča pri (nemobilnih) kritosemenkah izredno pomembno.

Pojav, ko pelod od cveta enega primerka rastline preide na brazdo cveta drugega primerka rastline iste vrste (konspecifičnost), imenujemo ksenogamija. Pri tem izmenjava genov vzdržuje ali povečuje delež heterozigotnosti in s tem načeloma omogoča boljši fitness populacije. Za najbolj razširjen in najbolj efektiven mehanizem proti samoopraševanju velja genetska inkompatibilnost (Lewis in Crowe 1958). Ta je definirana kot pred-zigotska (Barrett 1988) in jo določa lokus S z različnimi aleli (Pandey 1980). S-aleli (samo-sterilni geni) so geni, ki preprečujejo samooprašitev s kontroliranjem rasti pelodne cevi. V grobem ločimo dva tipa avto-inkompatibilnosti, in sicer homomorfno, kjer se osebki v populaciji med seboj morfološko ne razlikujejo, ter heteromorfno, kjer je opazna morfološka razlika med kompatibilnimi osebki. Homomorfna inkompatibilnost se deli še na sporofitsko, kjer starševski genotip določa kompatibilnost (stigma ponazarja inkompatibilne S alele) ter gametofitsko, kjer potomstvo določa kompatibilnost (pelod vsebuje inkompatibilne alele) (Real 1983; Willmer 2011). Gametofitska inkompatibilnost naj bi bila v celoti homomorfna, medtem ko naj bi bile pri sporofitski inkompatibilnosti nekatere vrste tudi heteromorfne (Briggs in Walters 2016). Slednja ima dva tipa, in sicer distilijo in tristilijo, kjer je razlika v višini namestitve vratu plodnice oziroma brazde in prašnic (Real 1983).

Poleg spolnega razmnoževanja (avtogamije, geitonogamije, ksenogamije) poznamo pri rastlinah tudi nespolno razmnoževanje (vegetativno razmnoževanje, apomiksa<sup>5</sup>). Vegetativno razmnoževanje je značilno za veliko večino alogamnih vrst (Briggs in Walters 2016).

---

<sup>4</sup> »In my volume 'On the Origin of Species' I have given only general reasons for my belief that it is apparently a universal law of nature that organic beings require an occasional cross with another individual ; or, which is almost the same thing, that no hermaphrodite fertilises itself for a perpetuity of generations.«

<sup>5</sup> Apomiksa je lahko tudi spolna, npr. pri anevsporiji lahko pride do rekombinacije genov (Briggs in Walters 2016).

Pojav, ko pelod iz cveta nekega primerka preide na brazdo istega cveta, imenujemo samooprašitev, ki lahko vodi v samooploditev – avtogamija. Pojavu, ko pelod iz cveta nekega primerka preide na brazdo drugega cveta istega primerka, pa pravimo geitonogamija. Oba načina sta genetsko identična procesa in ju zaradi možne rekombinacije genov v mejozi uvrščamo med spolno razmnoževanje. Posledično predstavljata pomemben doprinos genetske variabilnosti v neki populaciji (Willmer 2011). Avtogamija se pojavlja tudi pri številnih enoletnicah, za katere je značilna r-strategija, kar pomeni hitro produkcijo potomcev v kratkem časovnem obdobju (Aarssen 2000) z malo porabe energije za rastlino, saj ni ali pa je le deloma odvisna od opraševalcev (Raven 2002).

Kljub temu so reproduktivni sistemi bolj kompleksni, saj so vrste lahko obvezno ali pa fakultativno avtogamne/ksenogamne. Navkljub domnevni superiornosti ksenogamije (Darwin 1862), se kratkoročno gledano za uspešnejšo strategijo lahko izkaže tudi avtogamija, kar lahko preseneča (Briggs in Walters 1862) oziroma predstavlja evolucijski paradoks (Lewis in Crowe 1958).

### **1.2.3 Razmerje pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O razmerje)**

Prevladovanje določenega reprodukcijskega mehanizma pri rastlinah pogojujejo tudi nekateri biotski dejavniki, npr. sama aktivnost opraševalcev ali plenjenje cvetov s strani herbivorov (Asikainen in Mutikainen 2005; Willmer 2011). Po Bakerjevem zakonu (1955) so bile v zgodnjih sukcesijskih stadijih ali motenih ekosistemih bolj učinkovite avtogamne vrste. Cruden (1977) je ugotovil, da obstaja povezava med reprodukcijskim sistemom ter razmerjem med pelodnimi zrn in jajčnimi celicami, saj to razmerje bolje odraža evolucijski prehod reprodukcijske strategije (iz ksenogamije v avtogamijo). Slednje se veča od kleistogamije v smeri ksenogamije (preglednica 1). Avtogamna rastlina ima zato nizko P/O razmerje, saj je večja verjetnost, da že manjša količina ustreznih pelodnih zrn pristane na brazdi lastnega cveta, kar pomeni zagotovljeno oploditev in produkcijo semen, ki je znatno večja kot pri ksenogamnem načinu opraševanja. Obratno pa morajo ksenogamne rastline vložiti več energije v produkcijo peloda, ker uspeh oprašitve z opraševalci ni nujno velik (npr. izguba peloda med obiski konspecifičnih cvetov, nalaganje tujega peloda na brazde različnih vrst zaradi specifičnega vedenja opraševalcev itd.). Pri enokaličnicah preide uspešno le okoli 1 % celotnega konspecifičnega peloda na brazdo, z izjemo nekaterih orhidej (Harder 2000).

Preglednica 1: Reprodukcijski sistemi rastline glede na log P/O (povzeto po Cruden 1977)

Reprodukcijski sistem	log P/O
Kleistogamija	0,65
Obligatorna avtogamija	1,43
Fakultativna avtogamija	2,15
Fakultativna ksenogamija	2,81
Ksenogamija	3,65

#### 1.2.4 Prerazporejanje zalog (alokacija resursov)

Hermafroditске rastline, skladno z alokacijsko teorijo, nimajo neomejenih zalog energije; morajo jo razporejati tako v moško kot žensko spolno funkcijo, ki pa sta v negativni medsebojni korelaciji (Goldman 1986). Moška funkcija velja za energetske manj potratno v primerjavi z žensko (Willmer 2011). Brunet in Charlesworth (1995) sta izpostavila relativno alokacijo zalog med različnimi cvetovi posamezne rastline. Če prihaja do alokacije med posameznimi hermafroditскими cvetovi, pomeni, da med cvetovi obstaja nek selekcijski pritisk. S tem je tudi povezan razvoj cvetov. Če na neki rastlini istočasno zacveti več cvetov, se s tem poveča tudi možnost avtogamije ali geitonogamije, s tem pa se lahko zmanjša fitnes populacije (Szóllósi in sod. 2010).

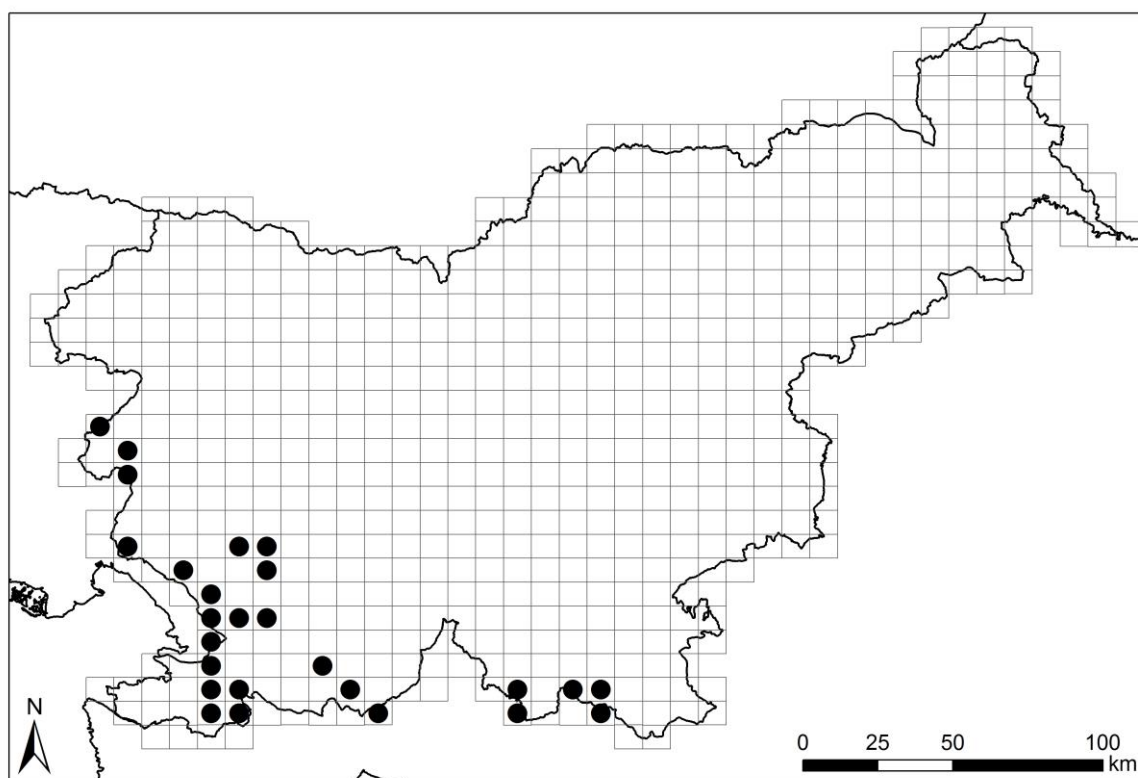
Prerazporejanje zalog nam lahko, hipotetično, pokaže vpogled v P/O razmerje. Avtogamne rastline za zagotovitev uspešne oprasitve in oploditve ne porabljajo veliko energije za proizvodnjo peloda, saj bo le-ta z večjo verjetnostjo pristal na konspecifični brazdi. Posledično je razmerje med jajčnimi celicami in pelodnimi zrnji majhno. To se lahko pokaže tudi kot zmanjšano vlaganje energije v moško funkcijo, če jo primerjamo z žensko funkcijo (Cruden 1997).

### 1.3 Ilirska perunika (*Iris illyrica* L.)

#### 1.3.1 Raznolikost perunik

Perunike predstavljajo kompleksen takson (Crespo in sod. 2015). V Evropi so zelo raznolike zaradi srečanja (sub)mediteranskih, alpskih in panonskih vplivov (Tutin in sod. 1980). V Sloveniji poznamo sedem vrst perunik in vse so zavarovane (z izjemo *I. foetidissima* L., ki je naturalizirana). So rastline vlažnih rastišč, močvirij, trstišč, senčnih gozdov, kot tudi suhih travnikov in kamnitih pobočij (Wraber 2007). V Sloveniji poznamo poleg perunik (rod *Iris*) še štiri rodove, ki pripadajo družini Iridaceae, in sicer rodove *Sisyrinchium* L., *Crocus* L., *Romulea* Maratti in *Gladiolus* L.

Mitić in sod. (2001) ilirsko peruniko (*Iris illyrica* Tomm.) obravnavajo na nivoju vrste. Je endemit severovzhodnih obal Jadrana (Mitić in sod. 2001). Wraber (1998, 2007) jo vrednoti na nivoju podvrste: *Iris pallida* subsp. *illyrica* (Tommasini) T.Wraber. V Sloveniji uspeva v submediteranskem fitogeografskem območju – na suhih kraških travnikih in v skalovju od nižine do montanskega pasu (Wraber 2007). Po kvadrantih srednjeevropskega kartiranja flore se njeno najbolj severno nahajališče v Sloveniji nahaja v kvadrantu 9947 (slika 1). Ta takson je zabeležen tudi v dinarskem in preddinarskem fitogeografskem območju, v dolini Kolpe na Kočevskem (Accetto 2015).



Slika 1: MTB mreža razširjenosti ilirske perunike v Sloveniji po kvadrantih srednjeevropskega kartiranja (vir podatkov: Bioportal.si, z dovoljenjem). Karta je ustrezno popravljena in dopolnjena z lastnimi podatki. En kvadrant obsega približno 35 kvadratnih kilometrov.

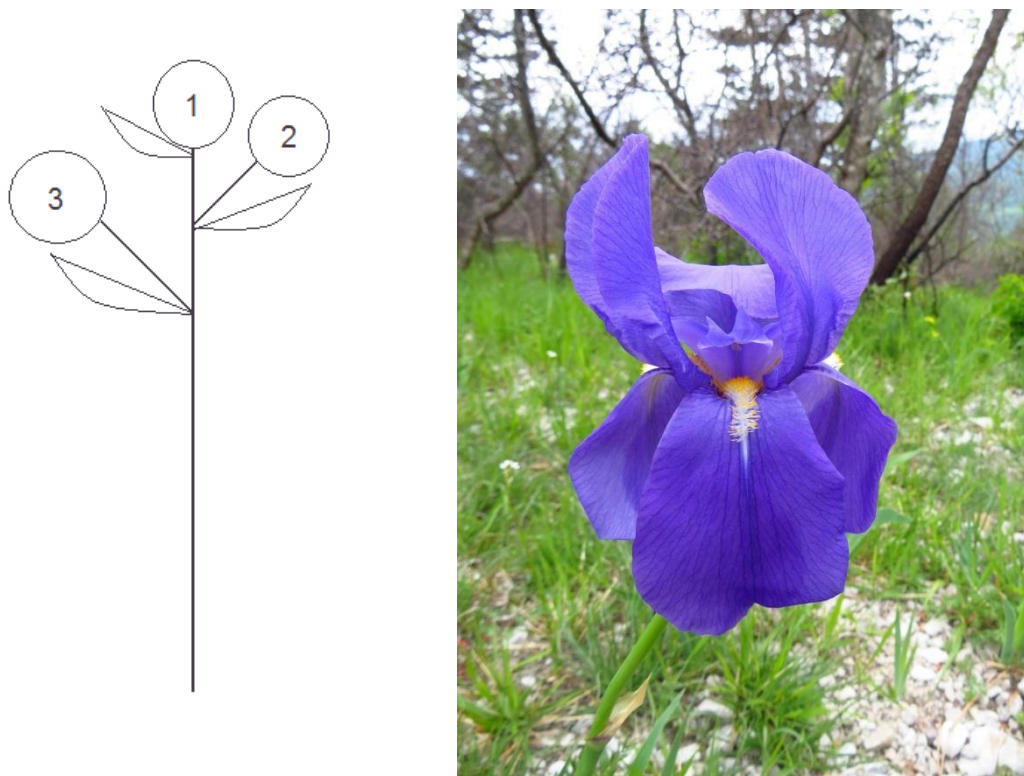
### 1.3.2 Opis reproduktivne regije

Prevladujejo po trije (2 – 4) cvetovi na stebelu. Ti se odpirajo s časovnim zamikom (slika 2). Sprva se odpre cvet, ki leži na najvišji poziciji (pozicija 1), nato sledi odprtje čisto spodnjega cveta (pozicija 3) in v končni fazi se odpre še srednji cvet, ki je nameščen na 2. poziciji (lastna opazovanja). Največ dva cvetova lahko cvetita istočasno, a večinoma odprtje enega cveta že nakazuje venenje drugega.



Listov cvetnega odevala je šest, ki so modificirani v dveh krogih po tri. Trije manjši, pokončni venčni listi, so glavni pri privabljanju oprasovalcev, saj jih zaradi pokončnosti oprasovalec hitreje opazi. Trije večji, ležeči venčni listi, so večinoma bolj barviti in poleg platforme za oprasovalce služijo tudi kot dodatna reklama za privabljanje oprasovalcev do nektarja. Ko oprasovalec pristane na platformi in se pomika proti ustju odevala, se sreča s t.i. petaloidno stigmo, pod katero so prilegli prašniki. Do oprasitve pride, ko se oprasovalec ob vstopu s hrbtno stranjo, na kateri se nahaja pelod, podrgne v notranji del brazde (Willmer 2011).

Vsak cvet perunike ima tri funkcionalne enote, ki pa med seboj niso povezane. Ločeno se izvaja tudi oprasovanje. Če funkcionalno enoto izoliramo, dobimo bilateralen cevast cvet (Westerkamp in Claßen-Bockhoff 2007).



Slika 2: Slika (levo) shematično prikazuje časovno razporeditev posameznih cvetov. Na najvišji poziciji se cvet odpre prvi, nato na zadnji poziciji (3) in na srednji poziciji (2). Slika (desno) prikazuje cvet *Iris illyrica*, v ospredju je vidna ena funkcionalna enota (shematski prikaz prirejen po Szöllösi in sod. 2010)

Nektar rastlini služi, da v času in prostoru lažje manipulira s ciljnim oprasovalci in si tako zagotovi boljšo in učinkovitejšo izmenjavo peloda. Čeprav ilirska perunika ne proizvaja nektarja, ima zelo sladek vonj. Navadno se vonj pri rastlinah izloča iz epidermisa v listih perigona. O samem vonju je sicer malo znanega (Richard 1997), je pa raziskava na vrsti *Iris atropurpurea* (npr. Vereecken in sod. 2013) pokazala, da vonj te vrste deluje zavajajoče za naivne samce solitarnih čebel (Apidae, Eucerini), saj nekatere hlapljive snovi

v vonju perunik (predvsem *n*-alkani in maščobne kisline) delujejo kot feromonska past. Generalno vonj služi kot vaba za opraševalce na daljavo (Richard 1997), kar je lahko pomembno pri vrstah, ki se nahajajo v habitatih z gostejšim vegetacijskih pokrovom, kjer sama barva cveta ni zelo opazna, ter za ukano še mladih, naivnih čebel, ki mislijo, da bodo dobile potreben obrok (Dötterl in Vereecken 2010).

Poleg velikosti in barve cvetov je za uspešno oglašanje zelo pomembna sinergija med barvo in vonjem rastline, ki sta v medsebojni biokemično-sintezni relaciji in tako ključni pri privabljanju opraševalcev (Wang in sod. 2013).

Vse vrste iz rodu *Iris* veljajo za avto-inkompatibilne, z izjemo avtogamne *Iris versicolor* (Kron in sod. 1993; Zink in Wheelwright 1997). Perunike imajo pelod, ki ohranja kalitvene sposobnosti do štiri dni, brazda pa je tudi dolgo časa receptilna (osebno opazovanje). Vrsta se razmnožuje tako spolno kot nespolno – z rizomi.

### 1.3.3 Etnobotanični vidik perunike

Človek je že v preteklosti opazil edinstveno vrednost perunik. Te niso omogočale samo materialne vrednosti, temveč tudi intrinzične. Zaradi njihove atraktivnosti za egipčanske kralje jih lahko spremljamo (kot gojene) že od obdobja starega Egipta. Z vidika simbolne vrednosti so *Iris* v stari Grčiji predstavljali kot kurirko, ki je potovala z mavricami od Olimpa do Zemlje in omogočala varen prehod do raja (King in Killens 2012). V francoski zgodovini ima perunika več pomembnih vlog. Ena izmed teh je spreobrnitev pogana v krščansko vero, ali viteza, ki mu je po njegovi smrti na glavi zrasla perunika z besedami *Ave Maria*<sup>6</sup> na vsakem venčnem listu. Njen simbol pa se ni uporabljal le v Franciji, kot kraljevi grb monarhije (*Fleur de Lis*), ampak tudi v Angliji, Bizantinskem cesarstvu, v armadi in dandanes tudi v grbu Bosne in Hercegovine, mestu Trst itd. Zaradi splošne uporabe besede »*lis*«, ki v francoščini pomeni lilija, se je pri mnogih uveljavilo ime lilija za rastline iz rodu *Iris* (King in Killens 2012), npr. v Bosni in Hercegovini peruniko imenujejo *ljiljan*.

---

<sup>6</sup> Franz Schubert, 1825

## **2 MATERIALI IN METODE**

### **2.1 Opis območja raziskave**

Kraški rob pri vasi Podpeč (Slovenija) in Liburnijski kras na območju Zebar (Hrvaška) sta bila območji naše raziskave, zaradi številčnosti populacije na obeh lokacijah.

Lokacija vzorčenja pri vasi Podpeč (45°31'46.4"N/13°54'07.7"E) je na približno 315 m nadmorske višine; nahaja se na prisojni legi travnatega kamnitega pobočja, ki tvori polico pod steno apnenčastega roba in je v fazi zaraščanja. Območje je vključeno v NATURA 2000 (identifikacijska št. področja SI3000276).

Lokacija vzorčenja na območju Zebar (45°14'33"N/14°41'18"E) se nahaja na kamnitih travnikih, okoli 850 m nadmorske višine. Območje predstavljajo kamniti in razpihani kraški travniki in spada pod NATURA 2000 (identifikacijska št. področja: HR2001300).

### **2.2 Terensko delo**

Dne 15. 04. 2016 smo v Podpeči nabrali še neodprte cvetove, jih označili glede na pozicijo in shranili v fiolah, v raztopini alkohola in glicerola (50:50). Skupno smo vzorec pobrali iz 17 primerkov. Dne 16. 06. 2016 smo nabrali še 40 neodprtih toda zrelih plodov za štetje semen v Podpeči, šest dni kasneje pa še 20 plodov na lokaciji Zebar, kar je služilo za primerjavo med različnima populacijama. Tudi plodove smo shranili in ustrezno označili glede na pozicijo. V maju 2017 smo nabrali še popke na lokaciji Zebar.

### **2.3 Laboratorijsko delo**

#### **2.3.1 Priprava vzorca**

Pri populaciji iz Podpeči smo popke odprli ter previdno odtrgali 3 prašnične niti z anterami in nato cvetove vrnil v primarno raztopino za kasnejše štetje jajčnih celic. Antere smo dali v kiveto in dolili 20 ml diluenta. Zaradi občutljivosti smo s pomočjo stereomikroskopa (Leica EZ4W) vsako prašnico prerezali navpično s pinceto in jo dali nazaj v kiveto. Če nam je kaj pelodnih zrn ostalo na pinceti ali na pokrovčku od kivete, smo nežno postrgali oz. sprali z diluentom nazaj v kiveto.

### 2.3.2 Štetje pelodnih zrn z elektronskim števcem delcev (Coulter Counter)

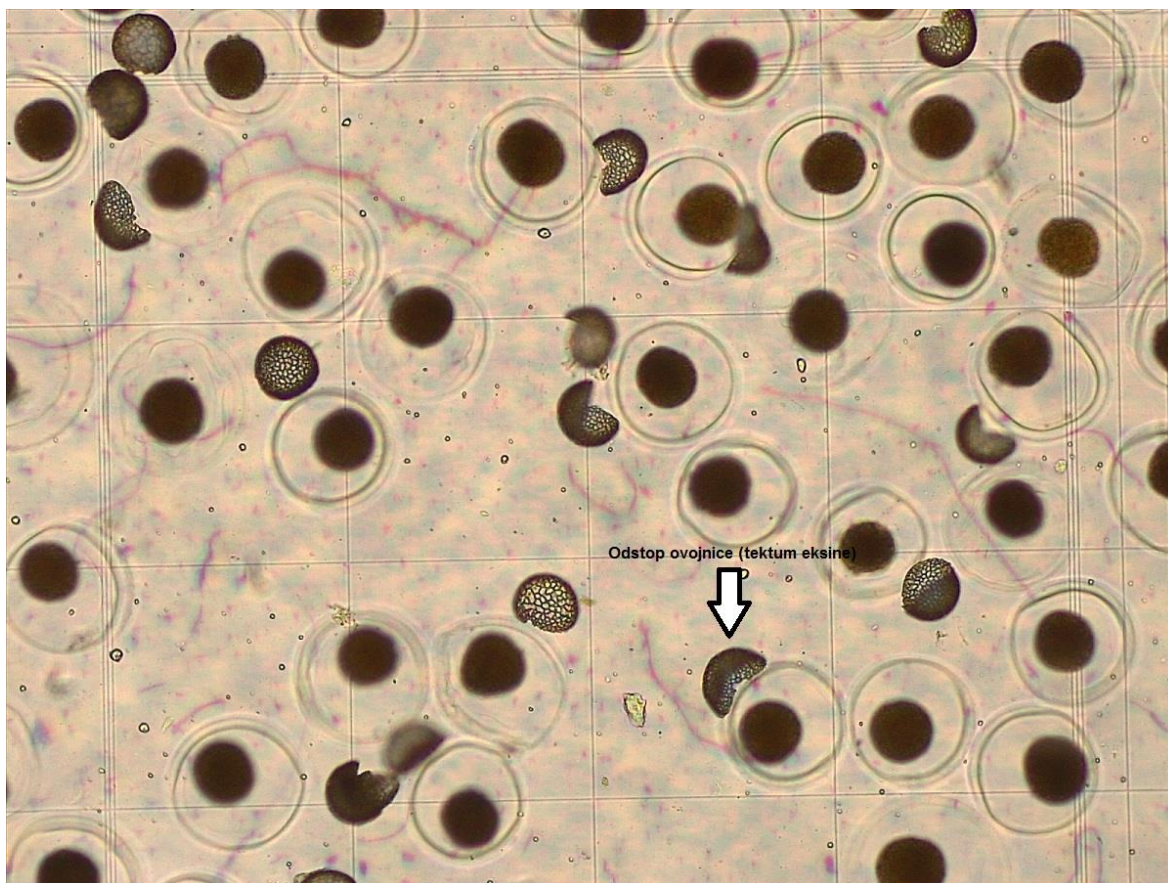
Oceno številčnosti pelodnih zrn smo izvajali na Z2 Coulter Counter. Pred začetkom štetja smo izvedli kalibracijo oz. umerjanje aperturne cevi z velikostjo 200  $\mu\text{m}$ . Za suspenzijo smo v čašo dodali 5 kapljic 10  $\mu\text{m}$  standarda, ki vsebuje 50 ml Izoton 2 razredčila in jo namestili na platformo, dokler aperturna cev, elektroda in mešalo niso bili zadostno potopljeni.

Podatke o velikosti peloda smo povzeli iz prispevka Mitić in sod. (2012), kjer so v tabeli 1 opisane lastnosti perunik. Vrsta *Iris illyrica* spada v kategorijo »Pollen type 1«, z velikostjo 90 – 100  $\mu\text{m}$ . Ker je prihajalo do tehničnega problema pri postopnem ožanju izbora velikosti, smo se odločili za spodnjo vrednost 70  $\mu\text{m}$  in zgornjo vrednost 110  $\mu\text{m}$ . Slednjo z razlogom, da zajame vrednost 100  $\mu\text{m}$ . Umerjen volumen (angl. *metered volume*) je bil 1 ml.

Pred pričetkom štetja je potrebno diluent temeljito premešati, da mešanica postane homogena in je tako odčitek količine peloda na 1 ml vzorca objektivni. Za vsak vzorec smo naredili pet ponovitev.

### 2.3.3 Štetje pelodnih zrn s hemocitometrom

Vsled nabrekanja peloda iz populacije Zebar (slika 3), štetje le-tega nismo mogli opraviti s Coulter Counterjem, kot smo to storili pri populaciji iz Podpeči. Zato smo si pri štetju peloda iz populacije Zebar pomagali s hemocitometrom. Tako smo od 20 ml odpipetirali 15 ml diluenta iz kivete in postopno jemali pelod in ga centrifugirali. Postopek smo ponavljali, dokler nam je v 1,5 ml mikrocentrifugirki ostal le še pelod. Nato smo dodali 1 ml etanola, centrifugirali, odlili etanol in pustili čez noč, dokler ni v celoti izhlapel. Pelodu smo dodali 50  $\mu\text{L}$  destilirane vode in prešteli pelodna zrna s pomočjo hemocitometra (Neubauer Improved), ki ima v stekelcu izdolbenih osem kvadrantov za štetje gostote delcev. Skupni volumen vseh osmih kvadrantov je 0,8  $\mu\text{L}$ . Slednje smo preračunali na 50  $\mu\text{L}$  celotne raztopine. Štetje pelodnih zrn smo izvajali v programu ImageJ po predhodnem fotografiranju s svetlobnim mikroskopom (Leica DM500, kamera ICC50W).



Slika 3: Primer štetja pelodnih zrn pod hemocitometrom. Zaradi diluenta so pelodna zrna nabrekla. Posledično lahko vidimo odstop ovojnice (tektum eksine) od pelodnega zrna.

### 2.3.3 Štetje jajčnih celic

Jajčne celice smo šteli s pomočjo stereomikroskopa (Leica EZ4W), kjer smo plodnico vzdolžno pazljivo prerezali in jajčne celice odstranili, če je le-to bilo možno. Te smo pod lupo tudi fotografirali in nato prešteli v programu ImageJ po predhodnem fotografiranju (slika 4).



Slika 4: Jajčne celice vrste *Iris illyrica* vidne pod stereomikroskopom

#### 2.3.4 Štetje semen

Plodove smo prerezali in semena prešteli s prostim očesom. Poleg dobro razvitih semen smo zabeležili tudi število abortiranih semen.

### 2.4 Statistična obdelava podatkov

Naredili smo enosmerno analizo variance (ANOVA) s pomočjo programskega paketa PAST 2.17 (Hammer & Harper) in preverili, če se rezultati štetja pelodnih zrn, jajčnih celic in semen med seboj statistično razlikujejo glede na pozicijo na rastlini in lokacijo. Homogenost varianc smo predhodno preverili s F-testom, enakomernosti porazdelitve pa s pomočjo Shapiro-Wilk testa.

S škatlo z brki smo prikazali razlike med pozicijami. Z razsevnim grafikonom smo preverili, če obstaja linearna povezanost med pelodnimi zrn in jajčnimi celicami glede na pozicije posameznih cvetov. Pri vseh testih smo za statistično pomembne razlike šteli tiste, pri katerih je bila verjetnost za sprejetje alternativne hipoteze manjša od 0,05 %.

Izračunali smo razmerje med pelodnimi zrn in jajčnimi celicami (P/O) ter pridobljene vrednosti logaritmirali in primerjali z vrednostmi po Crudenu (1977), prikazane v tabeli 1.

### 3 REZULTATI Z DISKUSIJO

#### 3.1 Pelodna zrna in jajčne celice v odvisnosti od pozicij

Največje povprečno število pelodnih zrn smo zabeležili na tretji poziciji pri populaciji Zebar ( $21.528 \pm 5936$  SD), najmanjše pa na drugi poziciji pri populaciji Podpeč ( $15.917 \pm 8211$  SD; preglednica 2). Opazno je tudi, da so minimalne in maksimalne vrednosti pri populaciji iz Podpeči nižje kot pri populaciji iz Zebra – najmanjši minimum je zabeležen na drugi poziciji v Podpeči z le 1640 pelodnimi zrn. Število jajčnih celic je bilo v povprečju, glede na pozicijo pri obeh populacijah, podobno, z največjo vrednostjo  $67 \pm 11.7$  SD in najnižjo vrednostjo  $50 \pm 13.8$  SD. Pri nekaterih osebkih so v tabeli prisotna prazna polja zaradi napak, do katerih je prišlo med samim štetjem pelodnih zrn ali pa zaradi manjkajoče plodnice.

*Preglednica 2:* Število pelodnih zrn in jajčnih celic (ločeno s poševnico '/') glede na pozicijo na lokacijah Podpeč (Z2 Coulter Counter) in Zebar (hemocitometer), s podanim povprečjem, standardnim odklonom (SD) ter minimumom in maksimumom.

Rastlina	Podpeč			Zebar		
	Pozicija			Pozicija		
	1	2	3	1	2	3
1	24680/76	10560/52	22640/61	27000/70	21687,5/66	18687,5/54
2	11300/52	17040/58	8900/46	19312,5/56	19000/47	22625/ -
3	15560/69	3540/60	9880/71	16125/34	16562,5/34	26312,5/46
4	-	-	-	21000/63	28437,5/46	23937,5/51
5	20020/67	1640/60	16070/72	10062,5/ -	20000/52	18812,5/ -
6	24420/51	8940/ -	13590/51	18875/ -	17250/58	18437,5/55
7	12360/64	8600/60	10980/50	18250/56	22187,5/78	18000/77
8	18920/72	11020/ -	13480/75	22812,5/64	16562,5/48	24250/61
9	13600/ -	23560/48	23360/43	20500/ -	16562,5/51	13062,5/73
10	-	-	-	33562,5/ -	18062,5/74	36687,5/54
11	25360/38	20840/60	17700/ -	13500/ -	23250/ -	23375/ -
12	21060/53	20720/41	28140/58	16187,5/78	19312,5/50	15000/66
13	13500/76	14400/35	19430/46	23625/82	- /34	20687,5/48
14	6280/74	22500/61	19460/64			
15	28220/ -	21340/42	28560/54			
16	16660/61	28280/55	28860/64			
17	9385/71	25780/52	21240/58			
<b>Povpr.</b>	17421/67	15917/55	18819/58	20062/63,5	19906/50,5	21528/54,5
<b>SD</b>	6488/11,7	8211,78/8,67	6702,10/10,29	5989,9/14,9	3535,78/13,83	5936,87/10,4
<b>Min</b>	6280/38	1640/35	8900/43	10062/34	16562/34	13062/46
<b>Max</b>	28220/76	28280/61	28860/75	33562/82	28437/78	36687/77

Z enosmerno analizo variance (ANOVA) smo ugotavljali statistično značilnost razlik v številu pelodnih zrn in jajčnih celic med pozicijami cvetov, rezultate prikazuje preglednica 3. Vse vrednosti po posameznih pozicijah cvetov za število pelodnih zrn in jajčnih celic so statistično neznačilne ( $p > 0.05$ ). Zato lahko sklepamo, da rastlina, glede na pozicijo cveta, razporeja enako količino zalog v moško funkcijo in žensko funkcijo. Za objektivnejši vpogled v stanje vlaganja zalog v moško spolno funkcijo, bi bilo potrebno opazovati in ujeti oprasovalce ter prešteti konspecifična pelodna zrna, ki se nahajajo na njih samih.

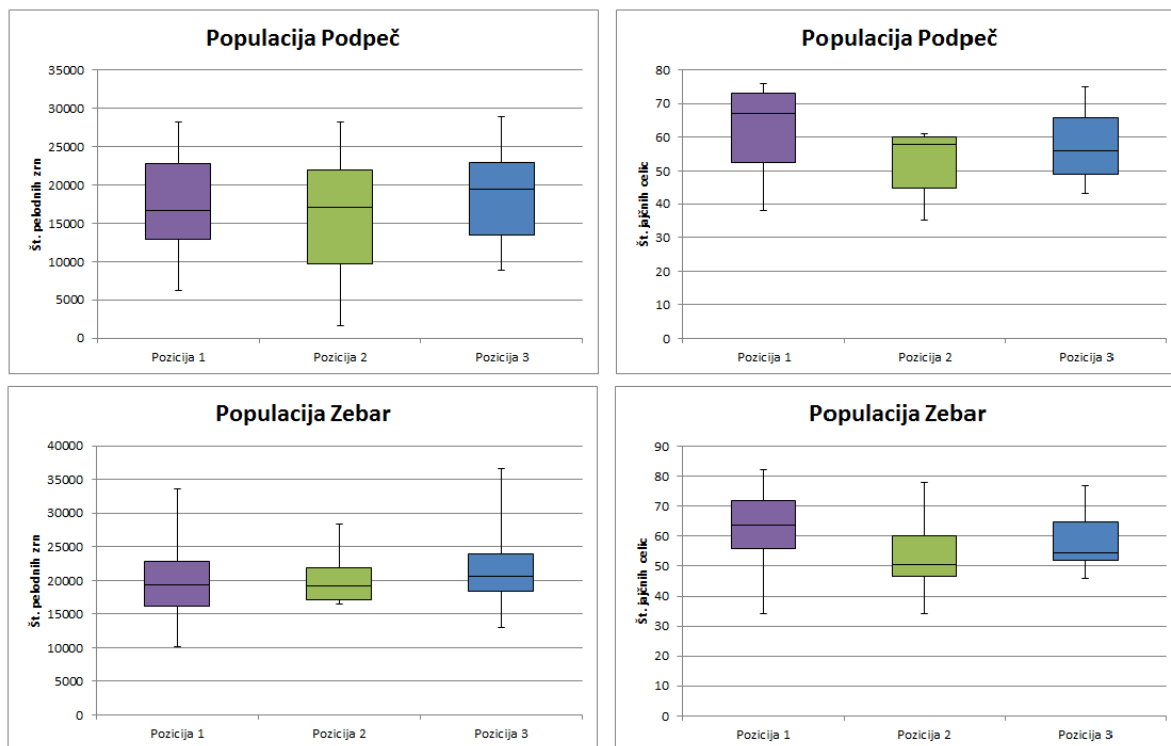
*Preglednica 3:* Primerjava števila pelodnih zrn in jajčnih celic po pozicijah cvetov med seboj in znotraj samih pozicij, z enosmernim testom analize variance (ANOVA). Podana imamo vira variabilnosti, vsoto kvadratov (SS), stopnje prostosti (Df), srednji kvadrat (MS), varianco med pozicijami (F) in mejno vrednost (p).

	<b>Vir variabilnosti</b>	<b>SS</b>	<b>Df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Število pelodnih zrn po pozicijah</b>	Med pozicijami	2,85E+13	5	5,71E+11	1,393	0,2361
	Znotraj pozicij	3,15E+14	77	4,10E+11		
<b>Število jajčnih celic po pozicijah</b>	Med pozicijami	1224,46	5	244892	1,822	0,121
	Znotraj pozicij	8,600,112	64	134,377		

Podatke smo prikazali grafično (s škatlo z brki), tako da smo pozicije primerjali glede na število pelodnih zrn in jajčnih celic pri obeh populacijah. Vsaka pozicija je prikazana po različni obarvanosti, kjer nam spodnji rob nakazuje prvi kvartil, zgornji rob tretji kvartil, sredinska črta pa predstavlja mediano. Iz slike 5 je razvidno, da ni večjih razlik v številu pelodnih zrn in jajčnih celic med pozicijami cvetov, tako na lokaciji Podpeč kot na lokaciji Zebar.

Vrednosti količine peloda iz lokacije Zebar, ki smo jih pridobili s štetjem s pomočjo hemocitometra, so bile v mejah pričakovanega in povsem primerljive s tistimi, ki smo jih pridobili s pomočjo Coulter Counterja za populacijo Podpeč.





Slika 5: Število pelodnih zrn in jajčnih celic glede na pozicije cvetov pri ilirski peruniki na lokacijah Podpeč (zgoraj) in Zebar (spodaj).

### 3.2 Pozicije v odvisnosti od P/O razmerja

Izračunali smo P/O razmerje za vsak posamezni cvet in za bolj nazoren prikaz smo vrednosti logaritmirali (glej tabelo 1  $\log(P/O)$ ). V tabeli 4 prikazujemo razmerja pelodnih zrn in jajčnih celic glede na pozicijo cvetov na lokacijah Podpeč in Zebar. Iz tabele je razvidno, da med obema populacijama pri vseh treh pozicijah ni večjega odstopanja v P/O razmerju, saj smo povprečje logaritmirane vrednosti dobili med 2.4 ( $\pm 0.23$  SD) in 2.6 ( $\pm 0.11$  SD). Najmanjša vrednost P/O razmerja (1.4) se nahaja na drugi poziciji pri populaciji Podpeč, največja pa na tretji poziciji pri populaciji Zebar (2.8). Te vrednosti P/O razmerja se ujemajo z najnižjimi vrednostmi pelodnih zrn, ki so razvidne iz tabele 2.

*Preglednica 4:* Prikaz logaritmirane vrednosti razmerja med pelodnimi zrni in jajčnimi celicami (P/O razmerje) glede na pozicijo cveta in rastline na lokacijah Podpeč in Zebar. Prav tako je prikazana mediana, povprečje, standardna deviacija ter minimum in maksimum.

Rastlina	Podpeč			Zebar		
	Pozicija ( $\log(P/O)$ )			Pozicija ( $\log(P/O)$ )		
	1	2	3	1	2	3
1	2,511	2,307	2,569	2,586	2,516	2,539
2	2,337	2,468	2,286	2,537	2,606	-
3	2,353	1,770	2,143	2,676	2,687	2,757
4	-	-	-	2,522	2,791	2,671
5	2,475	1,436	2,348	-	2,585	-
6	2,680	-	2,425	-	2,473	2,525
7	2,285	2,156	2,341	2,513	2,454	2,368
8	2,419	-	2,254	2,551	2,537	2,599
9		2,690	2,735	-	2,511	2,252
10	-	-	-	-	2,387	2,832
11	2,824	2,540	-	-	-	-
12	2,599	2,703	2,685	2,317	2,586	2,356
13	2,249	2,614	2,625	2,459	-	2,634
14	1,928	2,566	2,482			
15	-	2,705	2,723			
16	2,436	2,711	2,654			
17	2,121	2,695	2,563			
<b>Me</b>	2,419	2,566	2,523	2,530	2,537	2,569
<b>Povpr.</b>	2.401	2,412	2,488	2,520	2,558	2,553
<b>SD</b>	0,234	0,402	0,190	0,103	0,112	0,184
<b>Min</b>	1,928	1,436	2,143	2,317	2,387	2,252
<b>Max</b>	2,824	2,711	2,735	2,676	2,791	2,832

Razmerje med pelodnimi zrn in jajčnimi celicami je v negativni korelaciji z velikostjo samega peloda (Cruden 1997). Pelod ilirske perunike šteje za velikega – 90-100  $\mu\text{m}$  (Mitić in sod. 2012), kar se ujema z majhnim P/O razmerjem. Dodatno, pelod perunik je tudi dolgoživ (Szóllósi in sod. 2010; Watts in sod. 2013), kar je v negativni korelaciji s P/O razmerjem, saj rastlina producira manj peloda in prihrani na energiji.

Brazda ilirske perunike je dolgo receptilna (Surina, osebni stik 2017). Število pelodnih zrn je lahko v odvisnosti tudi s časovno receptilnostjo same brazde. Daljša receptilnost stigme omogoča večji reprodukcijski uspeh, zaradi večje možnosti oprasitve (Richardson in Stephenson 1989; Cruden 2000). Razmerje med številom pelodnih zrn in jajčnih celic je zato majhno (Cruden 2000). Skladno z delom Crudna (1977) sta populaciji Zebra in Kraškega roba fakultativno avtogamni; to bi pomenilo, da sta poleg alogamije zmožni tudi avtogamije, kar ni skladno z dosedanjimi navedbami v literaturi.

Cruden (1977) je opozoril na pomembnost strukture nekega habitata in sukcesijskega stadija na razmerje P/O. Vrste, ki so prisotne v motenih habitatih in habitatih zgodnjih sukcesijskih stadijev, naj bi imele manjše P/O razmerje in se posledično bolj nagibale k avtogamiji. To sovпада tudi z Bakerjevim zakonom, saj se s tem zmanjšuje kompeticijski pritisk in vrste niso (odvisno od stopnje motenosti habitata glede na reprodukcijski sistem) v veliki meri – ali sploh – odvisne od oprasovalcev. Nasprotno, v kasnejših sukcesijskih fazah, bliže klimaksnemu stadiju, prevladujejo ksenogamne vrste, zaradi večje zanesljivosti oprasovalcev.

Lahko bi sklepali, da z večanjem specializacije vrst upada njihovo P/O razmerje. Če ima ilirska perunika zveste in učinkovite oprasovalce, bi to lahko bil razlog, da rezultati določanja P/O razmerja nakazujejo fakultativno avtogamijo. Večja specializiranost na oprasovalca lahko posledično vodi v manjšo proizvodnjo peloda pod predpostavko, da so ti oprasovalci zelo učinkoviti.

Eden od razlogov za majhno P/O razmerje pri ilirski peruniki bi lahko bila velika sposobnost za klonalno razmnoževanje, pri čemer se resursi od spolnega razmnoževanja lahko prerazporedijo v nespolno. Ta razlaga temelji na predvidevanjih matematičnih modelov razmerij alokacije med kloni in spolno funkcijo (Dorken in Drunen 2010). Raziskave kažejo, da pri hermafroditih alokacija energije v klone vodi v večji izkoristek moške spolne funkcije, kljub posledičnemu zmanjšanju številčnosti peloda v posameznem klonu. To je možno zato, ker fitnes moške spolne funkcije ob začetnem vlaganju energije narašča zelo strmo, ob nadaljnjem večanju vložka pa se krivulja hitro ustali. Teoretično se rastlini izplača ustvariti klon tisti trenutek, ko krivulja moškega fitnesa v odvisnosti od

vložka energije doseže enako strmino kot krivulja ženskega fitnesa v odvisnosti od vložka energije, saj s tem rastlina maksimalno izkorišča strmino moške krivulje.

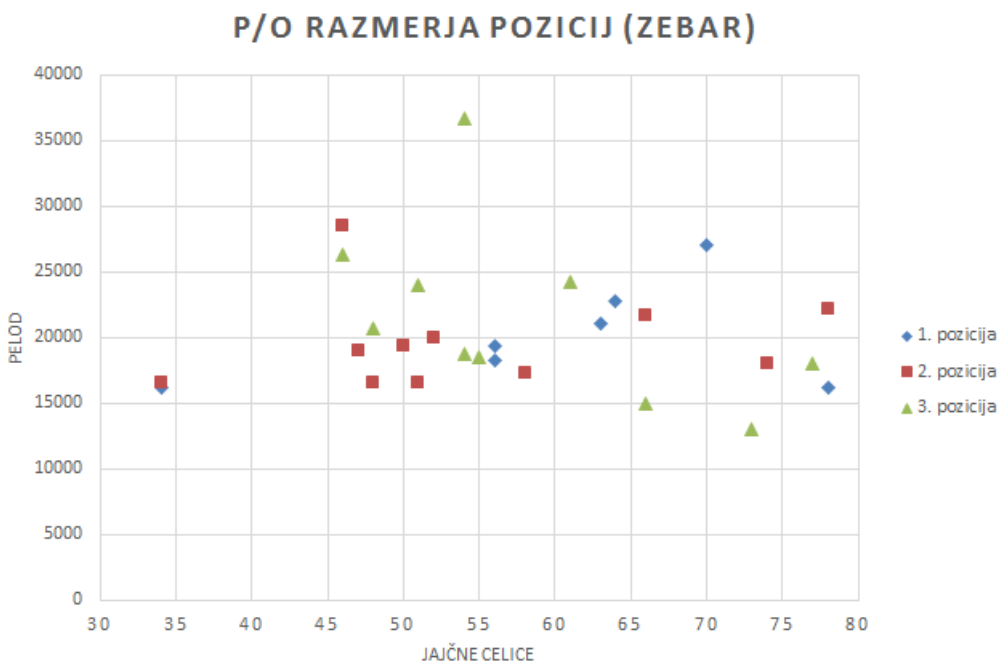
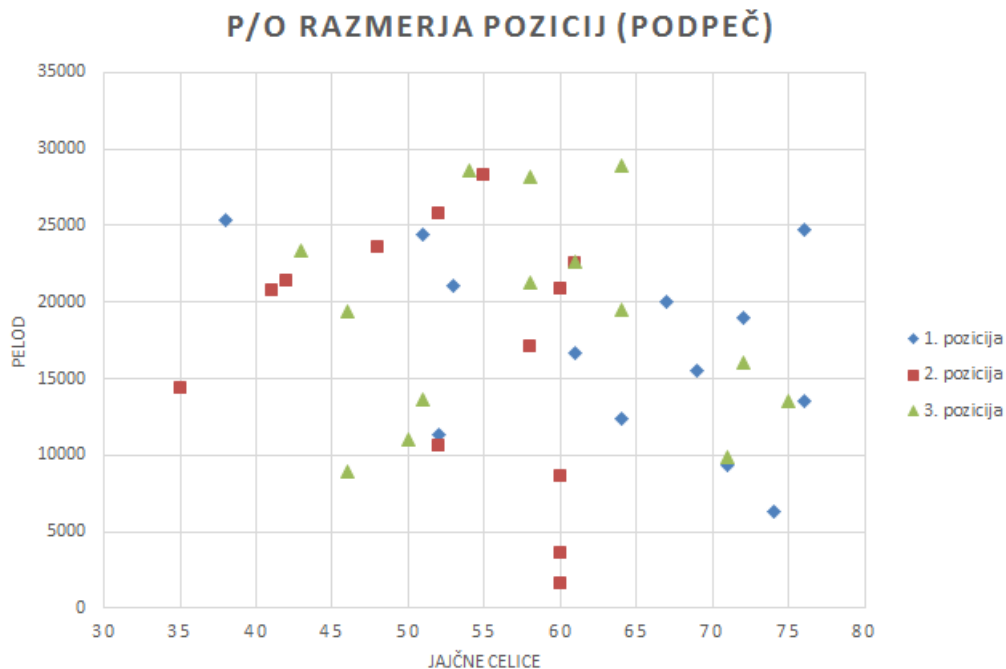
Posamezne razlike v P/O razmerjih med pozicijami smo testirali z enosmerno analizo variance (ANOVA), pri čemer nismo ugotovili statistično značilnih razlik na obeh lokacijah (preglednica 5).

*Preglednica 5:* Primerjava razmerja P/O med pozicijami z ANOVO na lokacijah Podpeč in Zebar. Podan imamo vir variabilnosti, vsoto kvadratov (SS), stopnje prostosti (Df), srednji kvadrat (MS), varianco med pozicijami (F) in mejno vrednost (p).

	Vir variabilnosti	SS	Df	MS	F	p
<b>Razmerje P/O po pozicijah</b>	Med pozicijami	70994,6	5	14198,9	0,6978	0,6271
	Znotraj pozicij	1,2818E06	63	20347,2		

Tako smo, poleg enosmernega testa analize variance, iz razsevnega grafa želeli prikazati možnost linearne povezanosti med spremenljivkama, in sicer med pelodom in jajčnimi celicami. Na sliki 6 vidimo dva razsevna grafa, kjer se zgornji navezuje na lokacijo Podpeč in spodnji na lokacijo Zebar. Za odvisno spremenljivko smo izbrali število pelodnih zrn (ordinatna os), za neodvisno spremenljivko pa število jajčnih celic (abscisna os). Zaradi precejšnje razpršenosti podatkov na obeh grafih je razvidno, da ne obstaja linearne povezanost med spremenljivkama.

Slika 6: Povezanost med spremenljivkama peloda in jajčnih celic na razsevnem grafikonu



### 3.3 Plodovi v odvisnosti od lokacije in pozicij

Populacija Kraškega roba je pri 40 primerkih producirala skupno 3075 semen, od tega 257 abortiranih. Populacija na Liburnijskem krasu je imela od 20 primerkov skupno 1161 semen, od tega 159 abortiranih.

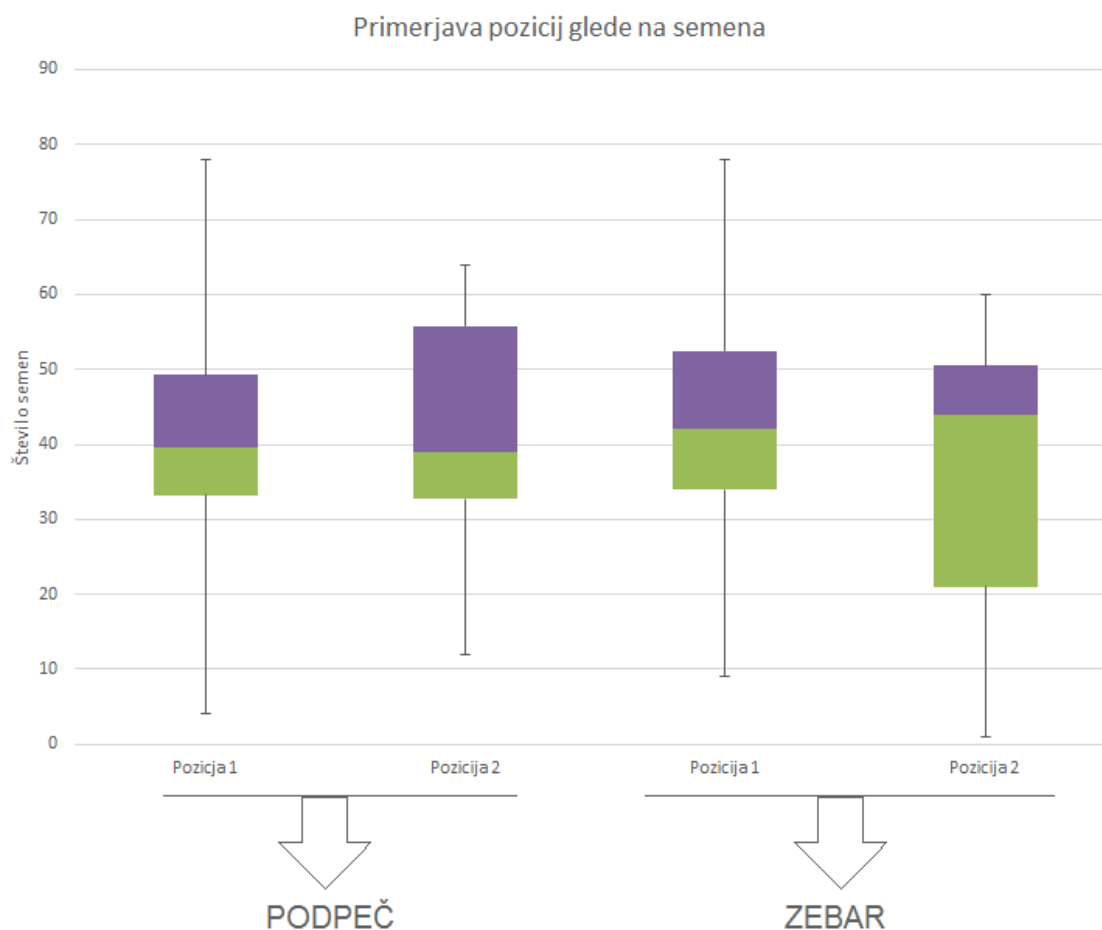
Posamezne razlike v številu semen med pozicijami znotraj populacij smo testirali z enosmerno analizo variance (ANOVA), pri čemer nismo ugotovili statistično značilnih razlik na obeh lokacijah. Tretje pozicije nismo upoštevali zaradi majhnega števila plodov.

*Preglednica 6:* Primerjava števila semen med pozicijami cvetov z ANOVO na lokacijah Podpeč in Zebar. Podan imamo vir variabilnosti, vsoto kvadratov (SS), stopnje prostosti (Df), srednji kvadrat (MS), varianco med pozicijami (F) in mejno vrednost (p).

	<b>Vir variabilnosti</b>	<b>SS</b>	<b>Df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Primerjava števila semen po pozicijah</b>	Med pozicijami	298,256	3	99,4186	0,4074	0,7481
	Znotraj pozicij	17814,7	73	244,037		

Te rezultate smo ponazorili še grafično, kjer so na sliki 7 prikazane štiri škatle z brki. Med pozicijami ni opazne razlike v številu semen, kar je skladno s testom ANOVA.

Populacija na Liburnijskem krasu tako producira statistično podobno število semen na pozicijo kot populacija na Kraškem robu.



Slika 7: Primerjava števila semen po plodovih glede na pozicijo med primerki populacij iz Podpeči in Zebri.

Glede na te podatke lahko sklepamo, da ni večjih razlik v pelodni ali opraševalski limitaciji (angl. *pollen limitation*; *pollinator limitation*), če ta sploh obstaja, med populacijama in med pozicijami znotraj populacij. Značilnost le-te je pogosta prisotnost v vsaki populaciji (Willmer 2011). V primeru razlike v produkciji semen bi lahko omejujoči faktor bil neuspešnost opraševalca ali pa problem s samim pelodom, če bi bila P/O razmerja podobna. Natančneje bi to pomenilo, da je produkcija semen omejena zaradi tega, ker na brazde ne pride količinsko dovolj peloda ali pa je pelod, ki prispe na brazde, »nekvaliteten« – izvira iz iste rastline ali pa je heterospecifičen (Wilmer 2011). Če upoštevamo, da je značilnost pelodne limitacije tudi močna variacija med populacijami, znotraj populacij med posameznimi cvetovi na posamezni rastlini, med rastlinami znotraj sezone in med različnimi sezonami (Wilmer 2011; Knight in sod. 2015) pa nam statistično podobnost P/O razmerja produkcije semen nakazuje na podobne dejavnike limitacije peloda.

## 4 ZAKLJUČEK

Rezultati določanja P/O razmerja pri ilirski peruniki na dveh raziskovalnih populacijah nakazujejo na fakultativno avtogamen način razmnoževanja, kjer se razmerje P/O giblje med 1.4 in 2.8, v povprečju 2.5, kar je sicer v nasprotju z navedbami v literaturi.

Razmerja med pelodnimi zrnji in jajčnimi celicami se po poziciji cvetov niso statistično pomembno razlikovala na primerkih obeh populacij, kot tudi pri primerjavi pozicij glede na število semen, kar nakazuje na to, da ne prihaja do razlik v prerazporejanju zalog med različnimi pozicijami cvetov pri populaciji na Kraškem robu in Liburnijskem krasu.

Najverjetneje obstaja še precej faktorjev, ki neposredno vplivajo na razporejanje zalog med spolnima funkcijama in ki bi jih bilo smiselno spremljati, npr. vpliv pelodne limitacije ali specifičnost oprasovalcev preko oprasovalnih eksperimentov (s tem tudi preveriti količino prenesenega peloda iz oprasovalca na konspecifično brazdo), saj bi s tem dobili še bolj jasno in točno sliko o reprodukcijskem sistemu obravnavanih populacij. Zanimivo bi bilo tudi preveriti viabilnost peloda, saj lahko to do neke mere določa količino proizvedenih pelodnih zrn, ter učinek proizvodnje klonov na alokacijo med spolnima funkcijama.



## 5 LITERATURA IN VIRI

Aarssen L.W. 2000. Why are most selfers annuals? A new hypothesis for the fitness benefit of selfing. *OIKOS* 98: 3.

Accetto M. 2015. Asociacija *Irido illyricae-Cotinetosum coggygriae* ass. nov. na Kočevskem. *Hladnikia* 35: 39–51.

Asikainen E., Mutikainen P. 2005. Preferences of Pollinators and Herbivores in Gynodioecious *Geranium sylvaticum*. *Annals of Botany* 95: 879–886.

Baker H.G. 1955. Self-compatibility and establishment after 'long distance' dispersal. *Evolution* 9: 347–348.

Barrett S.C.H. 1988. Mating system evolution and speciation in heterostylous plants. In *Speciation and its consequences*. Sunderland, MA: Sinauer. 257–83.

Barrett S.C.H., Hough J. 2013. Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany* 64(1): 67–82.

Barrett S.C.H. 2013. The evolution of plant reproductive systems: how often are transitions irreversible? *The Royal Society* 280(1765): 20130913.

Briggs D., Walters S.M. 2016. *Plant Variation and Evolution*. Četrta izdaja. Cambridge University Press. 89–134.

Brunet J., Charlesworth B. 1995. Floral sex allocation in sequentially blooming plants. *Evolution* 49(1): 70–79.

Coen E.S., Nugent J.M. 1994. Evolution of flowers and inflorescences. *Development Supplement* 107–116.

Crespo M.B., Martínez-Azorín M., Mavrodiev E.V. 2015. Can a rainbow consist of a single colour? A new comprehensive generic arrangement in the '*Iris sensu latissimo*' clade (Iridaceae), congruent with morphology and molecular data. *Phytotaxa* 232(1): 1–78.

Cruden R.W. 1997. Implications of evolutionary theory to applied pollination ecology. *Acta Horticulturae* 437: 27–51.

- Cruden R.W. 2000. Pollen grains: why so many? *Plant Syst. Evolution* 222: 143–165.
- Cruden R.W. 1977. Pollen-Ovule Ratios: A Conservative Indicator of Breeding Systems in Flowering Plants. *Evolution* 31(1): 32–46.
- Darwin C. 1862. On the Various Contrivances by Which British and Foreign Orchids are Fertilised by Insects, and on the Good Effects of Intercrossing. London
- Dorken M.E., Drunen F.V. 2010. Sex allocation in clonal plants: might clonal expansion enhance fitness gains through male function? *Evol Ecol* 24: 1463–1474.
- Dötterl S., Vereecken N.J. 2010. The chemical ecology and evolution of bee–flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology* 88: 668–697.
- East E.M., Mangelsdorf A.J. 1925. A new interpretation of the hereditary behaviour of self-sterile plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 11: 166–171.
- Gibbs P.E. 2014. Late-acting self-incompatibility – the pariah breeding system in flowering plants. *New Phytologist* 203: 717–734.
- Goldman D.A., Willson M.F. 1986. Sex Allocation in Functionally Hermaphroditic Plants: A Review and Critique. *The Botanical Review* 52(2): 157–194.
- Harder L.D. 2000. Pollen dispersal and the floral diversity of monocotyledons. *Monocots: Systematics and Evolution*. Ed. Wilson K.L., Morrison D. Melbourne: CSIRO Publishing. 243–255.
- King C., Killens W.R. 2012. *A Guide to Species Irises: Their Identification and Cultivation*. United Kingdom, Cambridge University Press 1–3.
- Kölreuter J.G. 1761. Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen. Darwin Estate and Cambridge University Library.
- Kron P., Stewart S.C., Back A. 1993. Self-compatibility, autonomous self-pollination, and insect-mediated pollination in the clonal species *Iris versicolor*. *Canadian Journal of Botany* 71(11): 1503–1509.

Lewis D., Crowe L.K. 1958. Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity* 12: 233–256.

Lloyd D.G., Barrett Spencer C.H. 1996. *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. Chapman & Hall.

Mitić B., Nikolić T., Liber Z. 2001. Morphological and karyological relationships within alpine-dinaric populations of the genus *Iris* L., Pallidae series (A. Kern.) Trinajstić (Iridaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 70(3): 221–227.

Mitić B., HalBritter H., Šoštarić R., Nikolić T. 2012. Pollen morphology of the genus *Iris* L. (Iridaceae) from Croatia and surrounding area: taxonomic and phylogenetic implications. *Plant Syst Evol* 299: 271–288.

Pandey K.K. 1977. Origin of Complementary Incompatibility Systems in Flowering Plants. *Theor. Appl. Genetics* 49: 101–109.

Pandey K.K. 1980. Evolution of Incompatibility Systems in Plants: Origin of 'Independent' and 'Complementary' Control of Incompatibility. *New Phytologist* 84: 381–400.

Raven P.H., Johnson G.B. 2002. *Biology*. 6. izdaja. McGraw-Hill, Boston, MA.

Real L. 1983. *Pollination Biology*. Academic Press Inc. 55–59.

Richard A.J. 1997. *Plant Breeding Systems*. London, Chapman & Hall.

Richardson T.E., Stephenson A.G. 1989. Pollen removal and pollen deposition affect the duration of the staminate and pistillate phases in *Campanula rapunculoides*. *American Journal of Botany* 76(4): 532–538.

Sprengel K.C. 1793. *Das entdeckte Geheimniss der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen*. Berlin.

Szőllősi E., Medvegy A., Németh A., Kálmán K., Mihalik E. 2010. Intra-inflorescence variations in floral morphological and reproductive traits of *Iris sibirica* L. *Acta Biologica Szegediensis* 52(2): 103–110.

Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters, S.M., Webb D.A. 1980. *Flora Europaea*, Volume 5: Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones). Cambridge University Press.

Wang H., Conchou L., Bessièrè J.M., Cazals G., Schatz B., Imbert E. 2013. Flower color polymorphism in *Iris lutescens* (Iridaceae): Biochemical analyses in light of plant–insect interactions. *Phytochemistry* 94: 123–134.

Westerkamp C., Claßen-Bockhoff R. 2007. Bilabiate Flowers: The Ultimate Response to Bees? *Annals of Botany* 100: 361–374.

Whitehouse H.L.K. 1950. Multiple-allelomorph Incompatibility of Pollen and Style in the Evolution of the Angiosperms. *Annals of Botany* 14(2): 199–216.

Willmer P. 2011. *Pollination and Floral Ecology*. Princeton University Press.

Wraber T. 2007. Iridaceae – perunikovke. V: Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M.A., Eler K., Surina B. 2007. *Mala Flora Slovenije. Ključ za določanje praprotnic in semenk*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 751–756.

Wraber T. 1998. Notulae ad nomenclaturam editionis *Mala flora Slovenije anni 1999 spectantes*. *Hladnikia* 10: 41–43.

Vereecken N.J., Dorchin A., Dafni A., Hötling S., Schulz S., Watts S. 2013. A pollinators' eye view of a shelter mimicry system. *Annals of Botany* 111: 1155–1165.

Zink R.A., Wheelwright N.T. 1997. Facultative Self-pollination in Island Irises. *American Midland Naturalist* 137(1): 72–78.