

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
SISTEM SPOLNEGA RAZMNOŽEVANJA
PRI BLAGAJEVEM VOLČINU
(*Daphne blagayana* FREYER)

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Sistem spolnega razmnoževanja pri Blagajevem volčinu
(*Daphne blagayana* Freyer)**

(Sexual reproductive system in Blagay's daphne (*Daphne blagayana* Freyer))

Ime in priimek: Erik Jurman
Študijski program: Biodiverziteteta
Mentor: doc. dr. Živa Fišer
Somentor: Manica Balant

Koper, september 2020

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Erik JURMAN

Naslov zaključne naloge:

Sistem spolnega razmnoževanja pri Blagajevem volčinu (*Daphne blagayana* Freyer)

Kraj: Koper

Leto: 2020

Število listov: 36

Število slik: 6

Število tabel: 2

Število prilog: 1

Št. strani prilog: 2

Število referenc: 56

Mentor: doc. dr. Živa Fišer

Somentor: Manica Balant

Ključne besede: Blagajev volčin, *Daphne blagayana* Freyer, biologija opraševanja, P/O razmerje, reproduktivne strategije rastlin

Izvleček: Blagajev volčin (*Daphne blagayana*) v Sloveniji velja za znamenito rastlino, a je o njegovi biologiji in ekologiji še veliko neznanega. Sodeč po literaturi se Blagajev volčin na slovenskih tleh razmnožuje večinoma vegetativno, plodov pa v naravi skorajda ne proizvaja. V zaključni nalogi smo želeli raziskati reproduktivne strategije pri tej rastlini, in sicer z opraitvenimi poskusi na terenu ter z ugotavljanjem razmerja med številom pelodnih zrn in semenskih zasnov (P/O razmerje). Za oceno številčnosti peloda smo še neodprte cvetove nabrali na lokacijah Jeterbenk in Polhograjska Grmada, reprodukcijske poskuse pa smo izvedli na dveh manjših površinah na Jeterbenku. Razmerje med pelodom in semenskimi zasnovami nakazuje na izrazito nagnjenost Blagajevega volčina k obligatni ksenogamiji. Opraitveni poskusi so pokazali nizek odstotek proizvodnje plodov pri vseh opraitvenih strategijah, kar za nekatere vrste volčinov navajajo tudi drugi avtorji. Za najbolj uspešno strategijo se je izkazala ksenogamija, za najmanj pa geitonogamija. Blagajev volčin je v manjši meri sposoben tudi proizvodnje plodov preko avtogamije. Z nastankom plodov pri vseh opraitvenih poskusih in najdbo plodov v naravi smo ovrgli navedbe, da se plodovi v Sloveniji ne pojavljajo.

Key document information

Name and SURNAME: Erik JURMAN

Title of the thesis:

Sexual reproductive system in Blagay's daphne (*Daphne blagayana* Freyer)

Place: Koper

Year: 2020

Number of pages: 36

Number of figures: 6

Number of tables: 2

Number of appendix: 1

Number of appendix pages: 2

Number of references: 56

Mentor: Assist. Prof. Živa Fišer, PhD

Co-Mentor: Manica Balant

Keywords: Blagay's daphne, *Daphne blagayana* Freyer, pollination biology, P/O ratio, plant reproductive strategies

Abstract: Blagay's daphne (*Daphne blagayana*) is considered a famous plant in Slovenia, but much is still unknown about its biology and ecology. According to literature, Blagay's daphne reproduces mostly vegetatively in Slovenia and produces almost no fruit in nature. In the graduation thesis we aimed to investigate the reproductive strategies of this plant, namely by experimental pollination treatments in the field and by determining the ratio between the number of pollen grains and ovules (P/O ratio). To assess the abundance of pollen grains, unopened flowers were collected at the locations of Jeterbenk and Polhograjska Grmada, and experimental pollination treatments were performed on two smaller areas on Jeterbenk. The relationship between pollen grains and ovules indicates a pronounced tendency of Blagay's daphne to obligatory xenogamy. Experimental pollination treatments showed a low percentage of fruit set in all pollination strategies, which is also stated by other authors for some species of daphnes. Xenogamy proved to be the most successful pollination strategy and geitonogamy the least. Blagay's daphne is also capable of producing autogamous fruits. With the formation of fruits in our pollination experiments and the finding of fruits in nature, we refuted the claims that fruits do not occur in Slovenia.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Živi Fišer za pomoč tako pri vodenju in izdelavi zaključne naloge kot tudi pri delu v laboratoriju in na terenu. Pri slednjem se za pomoč zahvaljujem tudi somentorici Manici Balant. Za pomoč pri izdelavi karte razširjenosti se zahvaljujem dr. Petru Glasnoviću.

Zahvalil bi se tudi svoji družini in vsem prijateljem, ki so me podpirali in stali ob strani v času študija.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	BIOLOGIJA SPOLNEGA IN NESPOLNEGA RAZMNOŽEVANJA RASTLIN1	
1.1.1	Reproduktivne strategije.....	1
1.1.2	Pomen reproduktivnih strategij v varstveni biologiji	4
1.2	BLAGAJEV VOLČIN (<i>DAPHNE BLAGAYANA</i> FREYER) NA SEVEROZAHODNI MEJI AREALA	4
1.2.1	Zgodovina odkrivanj, razširjenost in ogroženost	4
1.2.2	Morfološki opis	6
1.2.3	Razmnoževanje.....	9
2	METODE DELA	10
2.1	OBMOČJE RAZISKAVE	10
2.2	TERENSKO DELO	10
2.2.1	Zbiranje vzorcev za laboratorijske raziskave peloda.....	10
2.2.2	Oprašitveni poskusi	10
2.2.3	Zbiranje plodov	12
2.3	LABORATORIJSKO DELO	13
2.3.1	Ocena števila pelodnih zrn	13
2.4	OBDELAVA PODATKOV	13
3	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	15
3.1	ŠTEVILO IN VIABILNOST PELODNIH ZRN TER RAZMERJE MED PELODOM IN SEMENSKIMI ZASNOVAMI.....	15
3.2	BLAGAJEV VOLČIN IN OPRAŠITVENE STRATEGIJE.....	16
3.3	SMERNICE ZA NADALJNJE DELO	19
4	ZAKLJUČEK	21
5	LITERATURA IN VIRI.....	22

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava števila pelodnih zrn na cvet ter razmerja P:O (log) v populacijah na Polhograjski Grmadi in Jeterbenku.....	15
Preglednica 2: Prikaz skupnega števila opravljenih reprodukcijskih poskusov na dveh površinah na Jeterbenku (spodaj – spodnja površina, zgoraj - zgornja površina), števila nastalih plodov ter odstotka nastalih plodov pri opravljenih poskusih. Ge – geitonogamija, Ks – ksenogamija, Av – avtogamija, IA – inducirana avtogamija.	16

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Karta razširjenosti Blagajevega volčina v Sloveniji (vir podatkov: SloVegSi).	6
Slika 2: Morfologija cveta Blagajevega volčina (Halda in Haldova 2001).....	8
Slika 3: Levo: hrošč iz rodu <i>Meligethes</i> na cvetu Blagajevega volčina. Sredina: omeseneli plodovi Blagajevega volčina. Desno: seme Blagajevega volčina.	9
Slika 4: Levo: manipulirani cvetovi, označeni z različnimi barvami nitmi. Desno: razvita plodova pri poskusu ksenogamije, kar je razvidno iz črne barve niti.....	12
Slika 5: Nastali plodovi (v odstotkih \pm SE) Blagajevega volčina pri opravljenih oprašitvenih poskusih. Različne črke nad stolpci pomenijo statistične razlike med oprašitvenimi poskusi ($p < 0,05$).	17
Slika 6: Proizvodnja plodov glede na oprašitveno strategijo pri vrsti <i>D. miyabeana</i> . V levem delu grafa so prikazani rezultati za odprt habitat, v desnem delu pa za zaprt. Od leve proti desni: kontrola, onemogočen dostop mravelj, ksenogamija, inducirana avtogami. ...	18

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Slovar.

1 UVOD

1.1 BIOLOGIJA SPOLNEGA IN NESPOLNEGA RAZMNOŽEVANJA RASTLIN

1.1.1 Reproduktivne strategije

Razmnoževanje je proces, ki organizmom omogoča prenos genetskega materiala na prihodnje rodove in s tem ohranjanje in evolucijo vrst v času in prostoru. Rastline se lahko razmnožujejo spolno ali nespolno. Dva glavna načina nespolnega razmnoževanja sta vegetativno razmnoževanje in agamospermija, kjer seme nastane brez oploditve (Richards 1997). Tak način razmnoževanja lahko predstavlja alternativo spolnemu razmnoževanju, kadar je oprашevanje omejeno, npr. zaradi vremenskih razmer ali pomanjkanja opráševalcev (Willmer 2011).

Rastline so skozi evolucijo razvile različne reproduktivne strategije, s katerimi skozi razmnoževanje prenašajo svoje gene iz ene generacije v drugo (Richards 1997). Pomemben del spolnega razmnoževanja rastlin je oprášitev. Gre za prenos pelodnega zrna s prašnika na brazdo pestiča (Shivanna in Tandon 2014). Ko pride pelodno zrno v stik z brazdo, poteče še zadnja delitev generativne celice. Pelod se na brazdi hidrira in kali. Pri tem nastane pelodni mešiček, ki prodre v brazdo in raste navzdol skozi vrat pestiča, pri tem pa nosi vegetativno jedro in dve generativni jedri proti semenski zasnovi. V nadaljevanju se eno spermalno jedro zlije z jajčnim jedrom, drugo pa s polnima jedroma – pride do dvojne oploditve (Dermastia 2010, Willmer 2011).

Proces oprášitve je osnova za prenos in rekombinacijo genov. Glede na izvor peloda lahko govorimo o treh načinih oprášitve, in sicer o avtogamiji, geitonogamiji ali ksenogamiji. V literaturi se pogosto omenja tudi izraz alogamija, ki pa ga različni viri različno definirajo (glej poglavje Slovar; Batič in sod. 2011, Shivanna in Tandon 2014).

Prenos peloda na brazdo pa še ne nujno pomeni uspešne oprášitve in oploditve. Mnoge rastline imajo namreč mehanizme, ki preprečujejo samooprášitev in samooploditev, saj zavračajo lasten pelod (Richards 1997). Več o tem navajam v poglavju 1.1.1.3 Mehanizmi za preprečevanje samoopráševanja.

V praksi je večina rastlin razvilo mešane oprášitvene strategije (Richards 1997), kjer se razmerje med samoopráševanjem in navzkrižnim opráševanjem spreminja glede na biologijo in ekologijo določene vrste (Proctor in sod. 1996). Reproduktivne strategije so izpostavljene različnim intrinzičnim in okoljskim selekcijskim pritiskom. Med intrinzične

med drugimi uvrščamo morfologijo in spolnost cvetov, rastlin in populacij ter morebitno prisotnost mehanizmov za preprečevanje samooprašitve (Shivanna in Tandon 2014).

Cruden (1977) ugotavlja, da razmerje med številom pelodnih zrn in semenskih zasnov v cvetu (angl. »*pollen:ovule ratio*« ali P:O razmerje) do neke mere izraža oprasitvene strategije rastlin. Predpostavlja, da je število proizvedenih pelodnih zrn na cvet obratno sorazmerno z zagotovilom, da bo prišlo do oprasitve. Tako imajo kleistogamne rastline najnižje, obligatno ksenogamne rastline pa najvišje P:O razmerje. Razmerje P:O sicer ne drži pri vseh vrstah rastlin, vendar ga mnogi še vedno uporabljajo pri svojih raziskavah (Shivanna in Tandon 2014).

1.1.1.1 Obvezno in neobvezno navzkrižno oprasovanje (obligatna in fakultativna ksenogamija)

Številne rastlinske vrste izkazujejo fakultativno ksenogamijo, nekatere pa celo obligatno ksenogamijo (Richards 1997). Po Crudenu (1977) znaša logaritemsko P:O razmerje od 2,82 do 3,65 za neobvezno navzkrižno oprasovanje (fakultativno ksenogamijo) in več kot 3,65 za obvezno navzkrižno oprasovanje (obligatno ksenogamijo). Z vidika uspešnosti oprasovanja predstavlja fakultativna ksenogamija verjetno najbolj učinkovito strategijo oprasovanja, saj omogoča rastlini tvorbo semen tudi v primeru omejene prisotnosti ali celo odsotnosti oprasovalcev (Cruden 1977).

Vogler in Kalisz (2001) sta ob pregledu večine znanih podatkov o razmnoževalnih strategijah rastlin prišla do ugotovitve, da so pri večini rastlin prisotne mešane reproduktivne strategije. Navajata, da se pri 49 % vrst, ki jih oprasujejo živali, prisotnost navzkrižnega oprasovanja giblje med 20 % in 80 %. Sistem oprasovanja je torej, kot že rečeno, dinamičen (Shivanna in Tandon 2014).

Navzkrižno oprasovanje je pri večini rastlinskih vrst skoraj vedno ugodnejša strategija oprasovanja zaradi pomembnih prednosti pred samooprasovanjem. Navzkrižno oprasovanje poraja variabilnost, zaradi novih kombinacij alelov so rastline odpornejše na spremembe v okolju, pa tudi preprečuje mutacije in poškodbe genoma (Willmer 2011, str. 73).

1.1.1.2 Obvezno in neobvezno samooprasovanje (obligatna in fakultativna avtogamija)

Kljub mnogim prilagoditvam rastlin za privabljanje oprasovalcev in razširjanje peloda na druge osebkke so mnoge rastlinske vrste sposobne samooprašitve, pri nekaterih (približno 10-15 % semenk; Goodwillie in sod. 2005) pa je samooprašitev celo obvezna (Proctor in sod. 1996). Samooprašitev je prisotna pri številnih enoletnicah, primere obligatne avtogamije pa najdemo pri nas na primer tudi pri nekaterih kukavičevkah iz rodu

močvirnic, npr. *Epipactis muelleri* (Lipovšek in sod. 2006). Cruden (1977) za obvezno samoopraševanje navaja logaritemsko vrednost P:O razmerja od 1,43 do 2,15, za neobvezno samoopraševanje pa od 2,15 do 2,81.

Ksenogamne rastline so odvisne od zunanjega faktorja opraševanja. Pogosto je opraševalec žival, ki pelod prenese z enega na drug cvet. Pomanjkanje ustreznih opraševalcev v okolju lahko predstavlja resno oviro, ki ksenogamnim rastlinam onemogoča tvorbo semen in s tem ohranjanje populacije. Zmožnost proizvodnje semen prek samooprašitve brez zunanjega faktorja je v tem primeru prednost. V primeru samoopraševanja se genetska raznolikost vrste zmanjšuje, vendar je proizvodnja takih semen še vedno boljša kot odsotnost semen nasploh (Proctor in sod. 1996). Tako zagotovilo razmnoževanja se smatra za glavno gonilo pri evoluciji rastlin iz ksenogamnih v avtogamne vrste. Tudi pri avtogamnih vrstah ksenogamija ni popolnoma izključena. Mnoge avtogamne vrste občasno, ob prisotnosti primerne opraševalca, lahko tvorijo plodove prek ksenogamije (Shivanna in Tandon 2014).

1.1.1.3 Mehanizmi za preprečevanje samoopraševanja

Preprečitev samooprašitve se pri rastlinah lahko pojavlja kot mehanizem znotraj cveta ali kot mehanizem med cvetovi iste rastline (Willmer 2011) oz. celo med različnimi rastlinami. Ločeni enospolni (moški in ženski) cvetovi se lahko pojavljajo znotraj istega osebka ali na različnih osebkih. Pri dvodomnih ali diecičnih vrstah se moški in ženski cvetovi nahajajo na ločenih rastlinah (Shivanna in Tandon 2014), zato pri njih ne more priti do avtogamije, pa tudi ne do geitonogamije. Pri vrstah, kjer se ženski in moški cvetovi pojavljajo na istem osebku – govorimo o enodomnih ali monecičnih rastlinah – do avtogamije ne more priti, lahko pa pride do geitonogamije.

Tudi pri dvospolnih cvetovih se pojavljajo mehanizmi, ki preprečujejo oprašitev ali oploditev znotraj istega cveta. Mehanizem, pri katerem gre za časovno ločitev med sprostitvijo peloda in receptilnostjo brazde, imenujemo dihogamija. Pri protandriji se pelod sprosti pred dozoritvijo brazde, pri protoginiji pa brazda dozori pred sprostitvijo peloda. Pri drugem mehanizmu, imenovanem herkogamija, se pojavi prostorska ločitev med brazdo in prašnikom, tako da je možnost samooprašitve majhna (Shivanna in Tandon 2014).

Poleg prostorske in časovne ločitve spolov lahko pride do nezdržljivosti peloda in brazde iste rastline zaradi kemične zaznave, ki pelodnemu zrnu onemogoča oprašitev oz. oploditev (Shivanna in Tandon 2014). Pri sporofitni nezdržljivosti možnost združitve določa diploidni genotip starševske rastline in pelodno zrno zaradi biokemične nekompatibilnosti ne more kaliti na brazdi iste rastline. Pri gametofitni nezdržljivosti pa

možnost združitve določa haploidni genotip peloda. Pelod na brazdi pestiča kali, vendar se rast pelodnega mešička zaustavi v vratu pestiča, še preden doseže plodnico. Nezdržljivost se lahko pojavi tudi po tem, ko pelodni mešiček penetrira ovarij ali celo po oploditvi. Pri slednjem nastopi splav embrija (Willmer 2011).

1.1.2 Pomen reproduktivnih strategij v varstveni biologiji

Za ohranitev stabilne in viabilne populacije je ključno ohranjanje genetske diverzitete znotraj populacije. Ohranitev in preživetje populacije sta tako odvisna od uspešne reprodukcije, pretoka genov iz drugih populacij ter zadostne velikosti populacije (Kryštufek 1999). Izumiranje mnogih vrst v sedanjem času je posledica človeških dejavnosti, kot so npr. degradacija in fragmentacija habitatov, vnos tujerodnih vrst, klimatske spremembe in druge. Vse to ima za posledico zmanjšano sposobnost prenosa genov, ki vodi v zmanjšanje velikosti populacije in sčasoma lahko vrsta izumre. Pri mnogih rastlinah se kot zagotovilo za reprodukcijo pojavi samoopraševanje, ko se številčnost populacije spusti pod kritično mejo. Dolgoročno to pomeni zmanjšanje genetske diverzitete populacije in zmožnost prilagajanja na spremembe v okolju (Shivanna in Tandon 2014).

Oprašitev je torej ključna za porajanje novih kombinacij alelov pri rastlinah. Do oprašitve lahko pride s pomočjo abiotskih dejavnikov, na primer vetra ali vode, v večini primerov pa pri oprašitvi sodelujejo živali, med katerimi so daleč najštevilčnejši opraševalci žuželke. Skozi evolucijo se je med rastlinami in opraševalci razvil mutualistični odnos (Inouye 2013). Opraševalci spadajo med ključne vrste (ang. keystone species), za katere je značilno, da imajo na celoten ekosistem še posebej velik vpliv. Izginotje ključne vrste ima za posledico upad drugih vrst. S tem se spremenijo biotske interakcije, kar lahko vodi v verižno izumiranje. Izguba opraševalcev najbolj prizadene vrste, ki so obligatno ksenogamne in prilagojene na specifičnega opraševalca (Kryštufek 1999). Usoda mnogih rastlinskih vrst tako ne temelji zgolj na ohranitvi rastlin samih, temveč na ohranitvi mutualističnega odnosa z opraševalci (Kearns in Inouye 1997).

1.2 BLAGAJEV VOLČIN (*DAPHNE BLAGAYANA* FREYER) NA SEVEROZAHODNI MEJI AREALA

1.2.1 Zgodovina odkrivanj, razširjenost in ogroženost

Blagajev volčin je zavarovana in zaščitena vrsta slovenske flore. Na območju današnje Slovenije so ga prvič odkrili leta 1837 na Polhograjski Gori pri Polhovem Gradcu, ki velja za klasično nahajališče. Sicer so ga pred tem našli že leta 1780 v okolici Braševa na

Sedmograškem v današnji Romuniji, vendar je zaradi napačne določitve klasično nahajališče (*locus classicus*) ostalo na Gori pri Polhovem Gradcu. Rastlino je tam našel eden od kmetov in jo nesel pokazat Rihardu Ursiniju grofu Blagayu, ki je bil ljubitelj naravoslovja, zlasti botanike in mineralogije. Po njem je kasneje rastlina dobila vrstno ime. Informacija o novo odkriti vrsti je pritegnila celo takratnega saškega kralja Friderika Avgusta II., ki si je rastlino ogledal na njenem klasičnem nahajališču in podal predlog ter željo, da bodo Kranjci znali ohraniti in varovati Blagajev volčin ter tako preprečili njegovo uničenje. V takratnih časih je bila rastlina zelo priljubljena za nabiranje ter izdelavo butaric, kasneje pa so jo radi tudi sadili na vrtove. Po obisku saškega kralja je Blagajev volčin tudi dobil ime kraljeva roža (Praprotnik 2004).

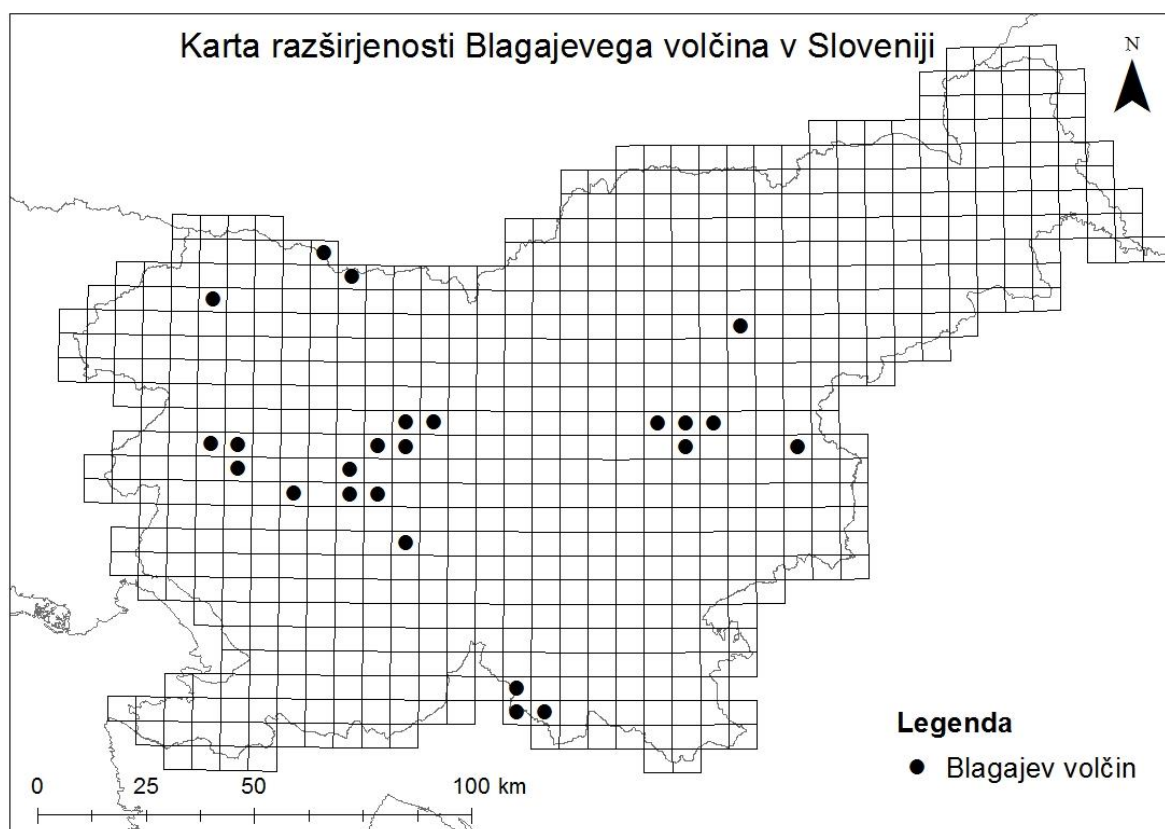
Zakonsko varstvo Blagajevega volčina se je začelo leta 1898, ko je Deželni zbor za Kranjsko sprejel Zakon o varstvu planik in kraljeve rože. Kasneje, leta 1922, so ga tudi uradno zavarovali (Praprotnik 2004). Danes je Blagajev volčin na Rdečem seznamu ogroženih praprotnic in semenk Slovenije uvrščen v kategorijo ranljivih vrst (Anonymous 2002). V Uredbi o Zavarovanih rastlinskih vrstah, ki so domorodne na območju Republike Slovenije, je uvrščen pod oznako H, ki predvideva zagotavljanje ukrepov za ohranjanje ugodnega stanja habitata rastlinske vrste (Anonymous 2004). Uvrščen je tudi v Uredbo o zvrsteh naravnih vrednot (2002), kjer spada pod kategorijo botanične naravne vrednote.

Blagajev volčin nima sklenjenega areala, temveč je razširjen fragmentirano od severovzhodne Italije, prek Slovenije ter Hrvaške naprej proti Bosni in Hercegovini, Srbiji in Črni gori, kjer je osrednji in največji del areala. Južna meja areala se razteza od Albanije, Makedonije in Grčije ter vzhodno preko Bolgarije in Romunije (Praprotnik 2004). V Sloveniji je znanih več nahajališč v Polhograjskem hribovju, v okolici Vrhnike in Idrije, v dolini Trebuše, na Kozjanskem ter Kočevskem in v hribih nad spodnjim tokom Savinje (Slika 1, Omejc in Brus 2005).

Fišer Pečnikar (2015) v svoji doktorski disertaciji ugotavlja, da se Blagajev volčin glede na markerje kloroplastne DNA in AFLP deli na tri klastre. Ti so razporejeni na območje na severu (v Sloveniji in Italiji), območje v osrednjem delu razširjenosti in območje na jugozahodu areala (v jugovzhodni Bosni in Hercegovini, v Črni Gori in v Makedoniji), kar nakazuje na obstoj večih glacialnih refugijev na Balkanskem polotoku. Predvideva, da so populacije Blagajevega volčina zaradi visoke genetske diferenciacije med seboj izolirane, med njimi pa ne prihaja do izmenjave genov.

Blagajev volčin je ostanek terciarne flore, ki ga uvrščamo v sekcijo *Daphnanthes*, kamor uvrščamo vrste, značilne za vzhodnoazijske lovorove gozdove. Od ostalih volčinov, ki uspevajo v Sloveniji, se loči po svoji razrasti, saj se njegovi poganjki plazijo po tleh, iz njih

se dvigajo le olistani vrhovi. Kot terciarni relikvni lovrolistnih gozdov se je Blagajev volčin tako prilagodil današnjim razmeram, saj ga pozimi pri tleh varuje sneg in stelja. Poleg tega so njegovi listi po obliki in zgradbi zelo podobni »lovrolistnim« volčinom iz vzhodne Azije (Praprotnik 2004). Wraber (2004) piše, da *D. blagayana* nekateri avtorji po krivici uvrščajo pod ilirski ali vzhodnoalpski pokrov, saj da gre v resnici za karpatsko-balkansko rastlino, ki pa se močno uveljavlja tudi v ilirskem prostoru. Pri nas uspeva na apnencu in dolomitu, najbolj pogost pa je na serpentinu v osrednjem delu svojega areala v Bosni in Hercegovini ter Srbiji. Pri nas najbolje uspeva v senčnem spodnjemontanskem bukovju iz zveze *Aremonio-Fagion* (Praprotnik 2004).



Slika 1: Karta razširjenosti Blagajevega volčina v Sloveniji (vir podatkov: SloVegSi).

1.2.2 Morfološki opis

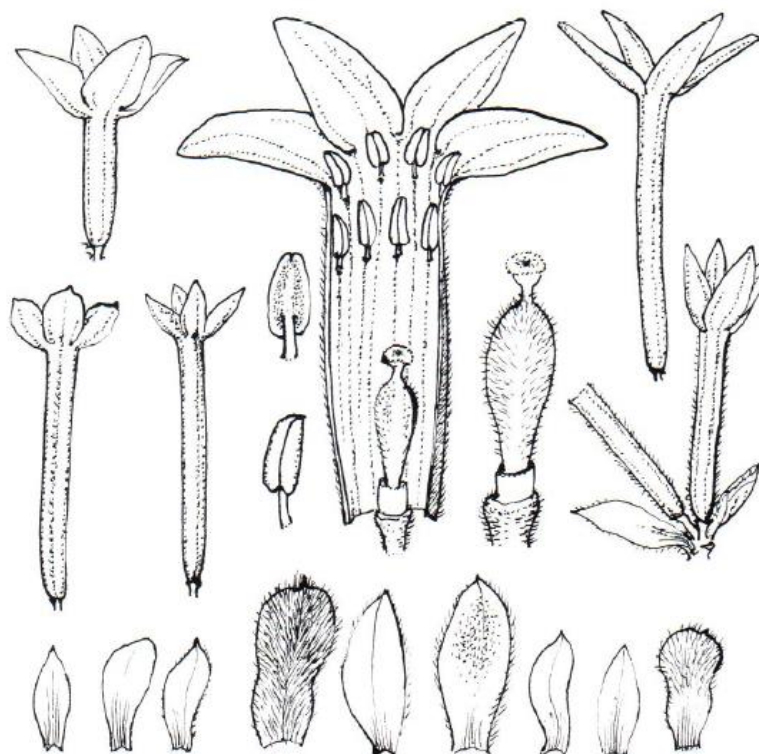
Blagajev volčin uvrščamo v družino volčinovk (*Thymelaeaceae*), ki obsega okoli 600 vrst, in v rod volčinov (*Daphne*), pri katerem je poznanih okoli 95 vrst. Glavni center razširjenosti volčinov je jugozahodna Azija (Halda in Haldova 2001), v Evropi pa izstopa Balkanski polotok, kjer uspeva 12 od skupno 17 evropskih vrst (Tutin in sod. 1993). V Sloveniji najdemo 6 vrst volčinov (Martinčič in sod. 2007). Prepoznavanje volčinov po vrstah je problematično, saj primanjkuje morfoloških prepoznavnih znakov (Jušković in sod. 2017). Halda (1999) kot enega pomembnejših morfoloških ločevalnih znakov navaja

obliko hipoginijskega diska pod plodnico, ki naj bi bil pri »tipičnih« volčinih večinoma v obliki obroča ali vrča.

Blagajev volčin je vednozelen pritlikav grmiček, ki v višino zraste do 30 cm (Tutin in sod. 1993). Tvori poleg kipeče poganjke, ki se pri kolencih lahko sproti zakoreninjajo (Brünsteiner 1957). Olistani so le terminalni deli poganjkov. Popki so nameščeni na koncu poganjkov. Vegetativni popki so ožji in koničasti, medtem ko so cvetni poganjki, ki se razvijejo že jeseni, bolj okrogle oblike. Mlada skorja je zelenkaste barve, kasneje postane temno rjava. Koreninski sistem je precej razvejan. Listi so narobe jajčasti, topi, usnjati in goli, dolgi od 3 do 6 cm in široki od 1 do 1,5 cm. Na zgornji strani so temno zeleni, spodaj pa svetlejši. Nameščeni so spiralno, na koncu poganjka pa tvorijo rozeto (Praprotnik 2004). Cvetovi se pojavljajo terminalno v simpodialnih socvetjih (kobulih) (Feliner 1996). Kasneje po cvetenju na bazi socvetij začnejo izraščati vegetativni poganjki. Socvetja obdajajo ovršni listi, ki so svetlo obarvani in svileni dlakavi. Zunanji ovršni listi so podolgovati in jajčasti, notranji pa črtalasto suličasti (Tutin in sod. 1993, Halda in Haldova 2001, Praprotnik 2004).

1.2.2.1 Reprodukativna regija

Pri Blagajevem volčinu je običajno od 10 do 20 močno dišečih cvetov združenih v terminalno nameščeno socvetje (Feliner 1996, Praprotnik 2004). Čašni listi so petaloidni, kremasto bele barve in močno dišijo. Združeni so v do 1,5 cm dolgo, na zunanji strani rahlo dlakavo kratkopecljato čašno cev, ki ima na zgornjem robu običajno 4 krajše, tope čašne roglje. Venčni listi manjkajo. Prašnikov je 8, nameščeni so v dveh krogih po 4. So skoraj sedeči, antere prašnikov pa so povezane z neznatnimi konektivi (Brünsteiner 1957). Plodnica je rahlo dlakava in pecljata (Praprotnik 2004), enopredalasta z eno semensko zasnovno (Brünsteiner 1957), hipoginijski disk pod njo pa je obročast s celim robom (Halda in Haldova 2001), ki izloča nektar. Brazda je lepljiva in hrapava (Brünsteiner 1957). Morfologija cveta je prikazana na Sliki 2.



Slika 2: Morfologija cveta Blagajevega volčina (Halda in Haldova 2001).

V Sloveniji cveti marca in aprila, lahko tudi v začetku maja. Je entomogamna rastlina, njen cvet pa je izrazito prilagojen na opraševanje metuljev (Lepidoptera), kar lahko sklepamo iz oblike, barve in vonja. Zaradi dolge in ozke čašne cevi lahko do nektarja pridejo samo žuželke z dolgim sesalom (Brünsteiner 1957). Rastlina proizvaja benzoidne estre, benzoidne alkohole, linalol in oksigenirane monoterpene. Te spojine so znane po tem, da privabljajo nočne metulje (Vukićević in sod. 2014). Na potencialno opraševanje nočnih metuljev kaže tudi bela obarvanost cvetov, ki je prav tako značilna za njihovo privabljanje (Real 1983). Nočne metulje kot opraševalce so že zaznali pri vrstah *Daphne sericea* (Aronne in sod. 1996, Barbi 2008) in *Daphne rodriguezii* (Sakata in Nakahama 2018). Nekateri avtorji poročajo o nizki obiskanosti cvetov npr. pri vrstah *D. miyabeana* (Sakata in Nakahama 2018), *D. laureola* (Alonso in Herrera 2001) in *D. gnidium* (Roccotiello in sod. 2009). Brünsteiner (1957) pa je na cvetovih *D. blagayana* opazila cvetne hrošče iz rodu *Meligethes* (Slika 3), ki jih kot glavne opraševalce pri vrsti *D. laureola* omenja Alonso (2004).



Slika 3: Levo: hrošč iz rodu *Meligethes* na cvetu Blagajevga volčina. Sredina: omeseneli plodovi Blagajevga volčina. Desno: seme Blagajevga volčina.

Blagajev volčin razvije enosemenske koščičaste plodove v juniju. Plod je gol, bel ali belozelen, omesenel in prozoren. Na njem pogosto ostanejo posušeni čašni listi (Slika 3). Semena so črne barve in po obliki narobe jajčasta, ki pogosto ne kalijo (Slika 3) (Praprotnik 2004).

1.2.3 Razmnoževanje

Literatura navaja, da v Sloveniji *D. blagayana* slabo plodi in kali (Praprotnik 2004) in se v glavnem razmnožuje le vegetativno (Brünsteiner 1957, Wraber 1964, Strgar 1975), medtem ko v osrednjem delu svojega areala bogato plodi in se razmnožuje tudi spolno (Praprotnik 2004). Brünsteiner (1957) v svoji diplomski nalogi razloge za prevladujočo vegetativno rast v Sloveniji vidi v neugodnih ekoloških razmerah za spolno razmnoževanje. Piše, da so za spolno razmnoževanje najprimernejši pogoji v topli in suhi klimi. Takrat se pojavlja več oprasovalcev in je tudi možnost oprasitve večja. Omenjeni pogoji se v času cvetenja v Sloveniji pojavijo zelo redko, kar je po njenem mnenju tudi razlog za prevladujoče vegetativno razmnoževanje. Vseeno pa pri svojih reproduktivnih poskusih potrdi možnost nastanka plodov tako pri avtogamiji kot pri ksenogamiji. Dakskobler in sod. (2011) so v povodju Idrijce našli precej poganjkov mladih rastlin, kar kaže na to, da je spolno razmnoževanje prisotno tudi v Sloveniji.

2 METODE DELA

2.1 OBMOČJE RAZISKAVE

Glavno območje raziskave se nahaja na Jeterbenku, 774 m visoki vzpetini v Polhograjskem hribovju. Del raziskave smo izvedli tudi na 898 m visoki Polhograjski Grmadi, ki se nahaja jugozahodno od Jeterbenka. Obe vzpetini spadata v reliefno enoto Osrednjega Polhograjskega hribovja. Gre za najbolj tipičen del Polhograjskega hribovja, kjer vrhovi hribov presegajo 500 m. V tleh prevladujejo rendzine na triasnem apnencu in dolomitu (Gabrovec 1990, Lavrič 2010).

Blagajev volčin na Jeterbenku uspeva na severozahodnem pobočju vzpetine, kjer raste v preprogah na apneni podlagi v senčnem spodnjemontanskem bukovju iz zveze *Aremonio-Fagion*. Rastišče na Polhograjski Grmadi se nahaja na severni strani vzpetine in je po površini manjše od tistega na Jeterbenku. Blagajev volčin tu raste na dolomitni podlagi v senčnem spodnjemontanskem bukovju iz zveze *Aremonio-Fagion* (Praprotnik 2004, Dakskobler in sod. 2011, Gabrovec 1990). Območje Polhograjske Grmade je uvrščeno na seznam naravnih vrednot državnega pomena kot vzpetina z bogatim in raznovrstnim rastlinstvom ter endemičnimi vrstami (Anonymous 2004).

2.2 TERENSKO DELO

2.2.1 Zbiranje vzorcev za laboratorijske raziskave peloda

Za oceno številčnosti peloda smo v razmaku dveh dni (6. 4. 2017 in 8. 4. 2017) na rastiščih na Jeterbenku in Polhograjski Grmadi nabrali 10 še neodprtih cvetov. Ti so bili nabrani na različnih rastlinah Blagajevega volčina in vsak posebej shranjeni v epice z etanolom.

2.2.2 Oprašitveni poskusi

Na lokaliteti Jeterbenk smo v 100 socvetjih prešteli število cvetov, da bi dobili povprečno število cvetov v socvetjih. Ker so podatki o plodenju rastline na območju Slovenije skopi in avtorji omenjajo celo odsotnost plodenja (Strgar 1975, Brünsteiner 1957, Derganc 1904, cit. po Brünsteiner 1957), smo najprej želeli preveriti, ali rastline na omenjenih lokalitetah plodijo.

Oprašitvene poskuse na Jeterbenku smo izvedli v aprilu leta 2018. Izbrali smo si dve manjši površini, kjer smo našli ustrezno gostoto cvetočih poganjkov, in ju poimenovali

zgornja (46°06'11.2"N, 14°23'11.2"E) in spodnja (46°06'14.7"N, 14°23'08.7"E). Vsako opraevalno strategijo (t.j. avtogamijo, inducirano avtogamijo, ksenogamijo in geitonogamijo) smo želeli na vsaki od obeh populacij ponoviti 15-krat (skupno torej 30-krat). Izbrali smo socvetja s še neodprtimi cvetovi in vsako rastlino označili z unikatno etiketo. V vsakem posameznem socvetju smo prešteli število cvetov ter pri 2 cvetovih odstrigli venčno cev tik nad brazdo. S tem smo odstranili vse prašnike in preprečili pojav avtogamije in inducirane avtogamije. Socvetja smo ovili z mrežo iz tila in s tem onemogočili potencialnim opraevalcem dostop do cvetov.

Enak postopek smo izvedli tudi pri spodnji populaciji. Ob prekrivanju socvetij z mrežo smo opazili, da so nekateri cvetovi v socvetjih že delno odprti. Zato smo se odločili, da na tej populaciji poskusov za avtogamijo in inducirano avtogamijo ne bomo izvedli. Obstajala je namreč možnost, da bi bili delno odprti cvetovi že opraešeni. Zato smo se odločili, da bomo pri spodnji populaciji na enem socvetju izvedli samo poskuse za ksenogamijo in geitonogamijo. Na enem socvetju smo tako izvedli 1–2 poskusa ksenogamije in 1–2 geitonogamije. Skupno smo tako manipulirali s tremi cvetovi na eno socvetje.

Zamrežena socvetja s še neodprtimi cvetovi smo ponovno obiskali čez en teden, ko so bili cvetovi odprti in v primerni fazi za poskuse opraeševanja.

Od označenih 15 rastlin na spodnji populaciji je pri enem primerku manjkala zaščitna mreža, zato smo to rastlino izločili iz raziskave. Na preostalih 14 socvetjih smo naredili skupaj 21 poskusov geitonogamije in 18 poskusov ksenogamije. Na zgornji populaciji pa smo poleg 15 poskusov geitonogamije in 15 ksenogamije izvedli še 29 poskusov avtogamije in 30 poskusov inducirane avtogamije.

Da bi preverili, če je pelod, ki ga uporabljamo v poskusih, viabilen, smo nabrani pelod iz druge populacije preverili s testom diaminobenzidina (DAB; SIGMAFAST™ DAB). Po eno tableto DAB/cobalt in eno tableto uree/vodikovega peroksida smo zmešali z 1 mL destilirane vode. Kapljico raztopine smo kanili na objektno stekelce in vanj potopili svež pelod. Stekelce smo posušili nad plamenom, dodali dodatno kapljico raztopine DAB in pokrili s krovnim steklom. Če se je pelod obarval rjavo, je pomenilo, da je pelod viabilen in primeren za opraešitvene poskuse.

Poskus geitonogamije smo izvedli tako, da smo iz enega od sosednjih cvetov istega socvetja vzeli pelod s pomočjo laksa, ali pa smo s pinceto odtrgali kar cel prašnik in ga prisloniti na brazdo cveta, kjer smo poskus izvajali. Rumena obarvanost brazde je pomenila, da je pelod prišel na brazdo in s tem opraešil cvet. Podoben postopek smo opravili še pri poskusu ksenogamije, le da smo za poskus uporabili pelod iz sosednje populacije, shranjen v epici. Cvetove, kjer smo izvedli manipulacije, smo ustrezno označili

z različnimi barvami niti. S črno nitjo smo označili ksenogamijo in z rumeno geitonogamijo. Po opravljenih poskusih smo socvetja ponovno prekrili z zaščitno mrežo.

Pri preizkusu avtogamije smo si izbrali naključen, še neodprt cvet v socvetju označene rastline in ga opremili z zeleno nitjo. Za poskus inducirane avtogamije smo s pomočjo laksa segli v venčno cev ter z njo na rahlo krožili okrog prašnikov. S tem smo spodbudili pelod, da je padel iz prašnikov na brazdo istega cveta. Te cvetove smo opremili z rdečo nitjo. Po opravljenih oprašitvenih postopkih smo vsa označena socvetja ponovno zakrili z zaščitno mrežo.



Slika 4: Levo: manipulirani cvetovi, označeni z različnimi barvami nitmi. Desno: razvita plodova pri poskusu ksenogamije, kar je razvidno iz črne barve niti.

2.2.3 Zbiranje plodov

Po približno mesecu dni, tj. konec maja 2018, smo pri vsakem označenem socvetju preverili nastajanje plodov in jih fotografirali. Pri postopku smo storili napako, saj zaščitnih mrež, ki smo jih uporabljali za zakrivanje socvetij, po fotografiranju nismo namestili nazaj na rastline. Ob naslednjem obisku Jeterbenka smo ugotovili, da je večino plodov, ki smo jih želeli nadalje uporabiti za kalitvene poskuse, že popadalo na tla. Uspeli smo nabrati 4 plodove, ki smo jih kasneje v laboratoriju fotografirali pod lupo in shranili v hladilnik za kalitev.

2.3 LABORATORIJSKO DELO

2.3.1 Ocena števila pelodnih zrn

Za štetje pelodnih zrn smo uporabili zaprte cvetove, ki smo jih nabrali na Jeterbenku in Polhograjski Grmadi. Iz cvetov smo izolirali prašnice, jih s skalpelom vsako posebej previdno prerezali in iz nje na krovna stekla z etanolom postopoma sprali vsa pelodna zrna. Preizkus štetja smo opravili pod mikroskopom, vendar smo se zaradi velikega števila pelodnih zrn kasneje odločili, da bomo za nadaljnje štetje peloda uporabili metodo štetja s pomočjo hemocitometra.

Prešteli smo pelod 5 cvetov z Jeterbenka in 5 cvetov s Polhograjske Grmade. Iz posameznih cvetov smo s pinceto postopoma odstranili prašnice. Te smo vsako posebej položili na krovno steklo, jih navlažili z etanolom in s skalpelom previdno prerezali po dolgem. Nato smo s pinceto in preparirno iglo postrgali pelodna zrna na pokrovček epice. Ko smo končali s posamezno prašnico, smo epico previdno zaprli in pretresli, da se je pelod nabral na dnu. Postopek smo ponovili za preostalih 7 prašnic v posameznem vzorcu.

Po končanem ločevanju peloda iz prašnic smo epice pustili odprte, dokler iz njih ni izhlapel ves etanol. Nato smo v posamezno epico s pipeto dodali 50 μ l destilirane vode. Pri tem smo morebiten pelod, ki je ostal na stenah epice, s curkom destilirane vode sprali, da se je nabral na dnu. S pipeto smo raztopino homogenizirali in odpipetirali na hemocitometer (Neubauer Improved), kjer smo prešteli pelodna zrna. Pri štetju smo se opirali na protokol, ki ga navaja Fujs (2015). Šteli smo v osmih za to namenjenih kvadratih, katerih skupni volumen znaša 0,8 μ l. Ker se pelodna zrna pojavljajo tudi na mejah kvadratov, peloda na meji zgornje in leve strani kvadratov nismo upoštevali, pelod na spodnji in desni meji pa smo vključili v štetje. Pelod smo šteli pod mikroskopom in si pomagali z mehanskim ročnim števcem. Skupno število pelodnih zrn za posamezen vzorec smo preračunali na volumen celotne raztopine, tj. 50 μ l.

2.4 OBDELAVA PODATKOV

Podatke, pridobljene na terenu, smo obdelali v programu Microsoft Excel 2013. Izračunali smo skupno število nastalih plodov ter odstotek uspešnosti nastanka plodov glede na posamezen oprašitveni poskus. Rezultate smo nato prikazali še grafično s stolpičnim diagramom. Za izračun statističnih razlik med posameznimi oprašitvenimi poskusi smo uporabili spletno aplikacijo MedCalc (<https://www.medcalc.org>).

Podatke iz laboratorija smo prav tako obdelali v programu Microsoft Excel 2013. Za posamezen vzorec smo podatke o številu pelodnih zrn, prešteti s hemocitometrom, preračunali na skupni volumen 50 μ l in tako dobili celotno število peloda v posameznem cvetu. Ker ima cvet Blagajevega volčina zgolj 1 semensko zasnovo, je bilo število pelodnih zrn enako razmerju P:O (Cruden 1977). Razmerje smo nato še logaritmirali.

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 ŠTEVILO IN VIABILNOST PELODNIH ZRN TER RAZMERJE MED PELODOM IN SEMENSKIMI ZASNOVAMI

Število pelodnih zrn je variiralo med 29000 in 61600 na Jeterbenku in 69300 in 105300 na Polhograjski Grmadi in se je med lokalitetama statistično razlikovalo ($P = 0.0003$; Preglednica 1); rastline z Jeterbenka vsebujejo v povprečju več kot dvakrat več pelodnih zrn na cvet. Morda gre razlog iskati v časovni razliki nabiranja še neodprtih cvetov na obeh lokacijah. Cvetove na Jeterbenku smo namreč nabrali, ko so bili vsi cvetovi v socvetjih večinoma še zaprti. Medtem pa smo neodprte cvetove na Polhograjski Grmadi nabrali nekoliko kasneje, ko je bilo precej cvetov že v polnem razcvetu. Nekatere raziskave so namreč pokazale, da se količina peloda v cvetovih lahko razlikuje v odvisnosti od časovnega odpiranja cvetov (npr. Thomson in sod. 1989). Cruden (2000) piše, da lahko med populacijami obstajajo razlike v številu pelodnih zrn in/ali jajčnih celic. Tudi Kikuzawa (1989) je za volčin vrste *D. jezoensis* zaznal razlike v številu peloda, saj navaja variiranje med 1000 in 7000 pelodnih zrn na eno prašnico. Cruden (2000) kot možne vzroke za razlike v številu pelodnih zrn omenja tudi napake pri vzorčenju ali razlike v okoljskih dejavnikih npr. učinkovitost opraševanja.

Razmerje med pelodom in jajčnimi celicami (Cruden 1977) nakazuje na izrazito nagnjenost Blagajevega volčina k obligatni ksenogamiji, saj logaritemsko P:O razmerje pri vseh vzorcih presega 3,65 (Preglednica 1).

Preglednica 1: Primerjava števila pelodnih zrn na cvet ter razmerja P:O (log) v populacijah na Polhograjski Grmadi in Jeterbenku.

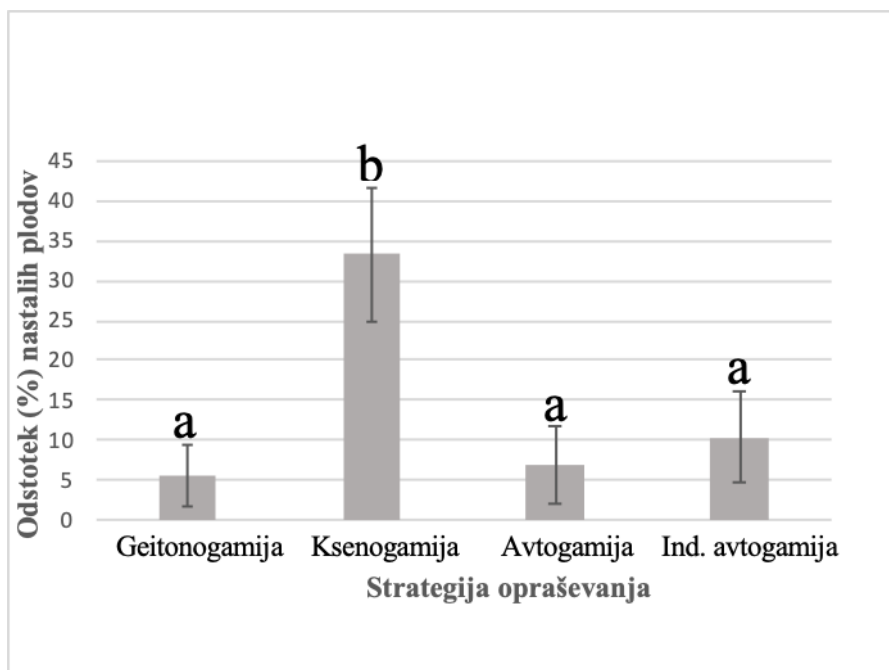
Polhograjska Grmada			Jeterbenk		
Št. vzorca	Pelod skupaj	log P:O	Št. vzorca	Pelod skupaj	log P:O
1	37000	4,57	6	69282	4,84
2	29000	4,46	7	84469	4,93
3	36750	4,57	8	88813	4,95
4	61594	4,79	9	78032	4,89
5	38250	4,58	10	105313	5,02
Povprečje±SD	40519±11032	4,59±0,11	Povprečje	85182±12024	4,93±0,06

3.2 BLAGAJEV VOLČIN IN OPRAŠITVENE STRATEGIJE

Na Jeterbenku ima Blagajev volčin v povprečju 15 (maksimalno 27, minimalno 6) cvetov v socvetju. Oprašitveni poskusi so pokazali, da je Blagajev volčin sposoben tvorbe semen tako na ksenogamen kot tudi na geitonogamen in avtogamen način (Preglednica 2 in Slika 5), vendar je uspešnost proizvodnje plodov pri vseh oprašitvenih strategijah nizka. Za najbolj uspešno strategijo pri nastanku plodov se je izkazala ksenogamija s $33,33 \pm 4,35\%$ (uspešnost \pm SD). Po uspešnosti so ji sledile inducirana avtogamija ($10,34 \pm 10,33\%$), avtogamija ($6,90 \pm 12,89\%$) in geitonogamija ($5,56 \pm 11,62\%$). Iz cvetov na etiketiranih rastlinah se je razvilo tudi 10 plodov brez našega posega. Poleg tega so se razvili še trije plodovi pri preizkušanih cvetovih, vendar so se niti, s katerimi smo označevali posamezen opraševalni poskus, snele s cvetov. Pri teh plodovih torej nismo mogli zagotovo določiti tipa reprodukcijske strategije. Iz tega lahko sklepamo, da pri označevanju cvetov lahko pride do nepredvidljivih dogodkov in da je za točnejše podatke priporočljiva označitev večjega števila cvetov.

Preglednica 2: Prikaz skupnega števila opravljenih reprodukcijskih poskusov na dveh površinah na Jeterbenku (spodaj – spodnja površina, zgoraj - zgornja površina), števila nastalih plodov ter odstotka nastalih plodov pri opravljenih poskusih. Ge – geitonogamija, Ks – ksenogamija, Av – avtogamija, IA – inducirana avtogamija.

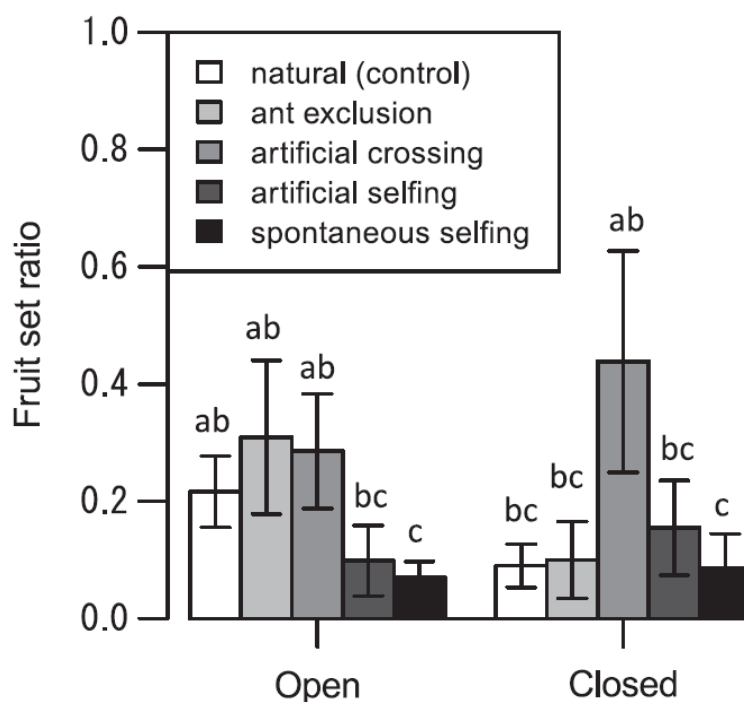
	spodaj		zgoraj			
	Ge	Ks	Ge	Ks	Av	IA
Število poskusov	21	18	15	15	29	29
Število nastalih plodov	1	5	1	6	2	3
Odstotek (%) nastalih plodov	4,8	27,8	6,7	40,0	6,9	10,3



Slika 5: Nastali plodovi (v odstotkih \pm SE) Blagajevga volčina pri opravljenih oprašitvenih poskusih. Različne črke nad stolpci pomenijo statistične razlike med oprašitvenimi poskusi ($p < 0,05$).

Mnogi avtorji, ki so raziskovali sistem spolnega razmnoževanja pri rodu *Daphne*, navajajo na splošno nizek odstotek nastanka plodov ter naklonjenost k navzkrižnemu opraševanju. Rodríguez-Pérez in Traveset (2011) sta pri vrstah *D. rodriguezii* in *D. gnidium* ugotovila bistveno večjo uspešnost proizvodnje plodov pri ksenogamnem opraševanju v primerjavi z avtogamnimi. Za *D. rodriguezii* je bila ugotovljena 24 % uspešnost tvorbe plodov pri ksenogamiji, pri avtogamiji pa se plodovi sploh niso razvili. Pri *D. gnidium* je ksenogamno opraševanje rezultiralo v 14 % uspešnosti proizvodnje plodov in v 1 % pri avtogamni oprašitvi. Roccotiello in sod. (2009) pišejo, da je reprodukcijski uspeh pri *D. gnidium* nizek in da plodovi pogosto ne dozori. Pri naključno označenih rastlinah na prostem so ugotovili, da več kot polovica cvetov popada na tla takoj, ko odcvetijo, in zgolj 5 % plodov popolnoma dozori. Ugotovili so, da so razlogi za to v degeneraciji ženskega spolnega aparata, medtem ko je proizvodnja in viabilnost peloda normalna. Predvidevajo, da bi ta pojav lahko bil povezan z mehanizmom za preprečitev samooprašitve. Podoben trend nizkega odstotka razvitih plodov je bil ugotovljen tudi pri vrsti *D. miyabeana*, in sicer med 9 % pri avtogamiji in 31 % pri ksenogamiji (Sakata in Nakahama 2018). V študiji so preučevali tudi vpliv odprtega in zaprtega habitata na uspešnost razvoja plodov. Ugotovili so, da se med habitatoma skupna uspešnost razvoja plodov ne razlikuje, se pa med habitatoma razlikuje uspešnost razvoja plodov glede na način oprašitve. Pri odprtem habitatu se je ob spontani avtogamiji razvilo statistično manj plodov kot pri kontroli, ksenogamiji in poskusu, pri katerem je bil preprečen dostop mravelj do cvetov ($p < 0,001$). Pri zaprtem habitatu pa se je ob spontani avtogamiji razvilo statistično manj plodov le od ksenogamije, od ostalih strategij pa se odstotek ni statistično razlikoval. Med habitatoma so

se razlikovale tudi kontrole v naravnem okolju, pri čemer je v odprtem habitatu nastalo več plodov kot v zaprtem (Slika 6). Tekom poskusov so pri zaprtem habitatu opazili, da se na cvetovih pogosto zadržujejo mravlje, ki ne sodelujejo pri opraitvi. Na odprtem habitatu so cvetove najpogosteje obiskovale čebele, ki pa so uspešne opraitvalke. Manjša uspešnost proizvodnje plodov pri kontroli v zaprtem habitatu bi bila lahko posledica pomanjkanja obiska opraitvalcev ali pa pojava, pri katerem avtogamni pelod zamaši stigma na istem cvetu (ang. stigma clogging) in prepreči kalitev ksenogamnega peloda. Pri zamašitvi stigme z lastnim pelodom bi lahko sodelovale mravlje. V odprtem habitatu do omenjenega pojava zaradi številčnosti čebel ne more priti (Sakata in Nakahama 2018). O pojavu zamašitve stigme z lastnim pelodom pri *Daphne kamtschatica* var. *jezoensis* (sinonim *Daphne jezoensis*) poroča tudi Kikuzawa (1989). Zaradi počasnega premikanja mravelj čez rastline Sakata in Nakahama (2018) predvidevata, da *D. miyabeana* verjetno spodbuja geitonogamijo. Primerjavo glede počasnega premikanja in daljšega zadrževanja na rastlini najdeta pri cvetnih hroščih rodu *Meligethes*, ki velja za opraitvalca *D. laureola* (Alonso 2004). Omenjeni hrošči se sicer hranijo z nektarjem in pelodom, včasih pa povzročijo tudi opraitev (Proctor in sod. 1996). V času terenskega dela na *D. blagayana* prav veliko opraitvalcev nismo opazili. Še najpogosteje so se v cvetovih zadrževali prav cvetni hrošči iz rodu *Meligethes*, ki jih omenja tudi Brünsteiner (1957) (Slika 3).



Slika 6: Proizvodnja plodov glede na opraitveno strategijo pri vrsti *D. miyabeana*. V levem delu grafa so prikazani rezultati za odprt habitat, v desnem delu pa za zaprt. Od leve proti desni: kontrola, onemogočen dostop mravelj, ksenogamija, inducirana avtogami.

Odvisnost od ksenogamnega peloda je bila ugotovljena še pri vrstah *D. jezoensis*, kjer je sicer avtogamija možna (Shibata in sod. 2018), in *D. sericea*, kjer pa do samooprašitve ne prihaja (Aronne in sod. 1996, Barbi 2008). Pri *D. laureola* sta prav tako možni ksenogamija in avtogamija (Medrano in sod. 2005), kjer je uspešnost razvoja plodov med 11 % in 33 % (Alonso in Herrera 2001).

Daphne laureola je tudi ena izmed vrst volčinov, pri kateri je bil ugotovljen pojav ginodiecicnosti (Alonso in Herrera 2011). Ta pojav je poznan tudi pri nekaterih drugih vrstah volčinov, na primer pri *D. jezoensis* (Shibata in Kudo 2017, Kikuzawa 1989) in *D. miyabeana* (Sakata in Nakahama 2018). Ginodiecicnost velja za pomemben evlucijski pojav, kjer hermafroditska rastlinska vrsta prehaja v dvodomno vrsto (Webb 1999). Tako v isti populaciji sobivajo hermafroditski in ženski primerki iste vrste. Ginodiecija se pojavlja pri 2 - 7 % vrstah kritosemenk (Dufay in Billard 2012). Nekateri avtorji menijo, da gre celoten rod *Daphne* skozi evlucijsko spremembo v razmnoževalnem sistemu. Na to nakazujejo variabilni sistemi razmnoževanja ter zelo nizek odstotek proizvodnje plodov (Roccotiello in sod. 2012, Rodríguez-Pérez in Traveset 2011). Roccotiello in sod. (2009, 2012) so pri raziskovanju *D. gnidium* prišli do zaključka, da gre ta vrsta volčina skozi spremembo spola iz hermafroditizma v moško enodomnost ali moško dvodomnost pod pritiski mediteranskega okolja. Aronne in Wilcock (2006) ugotavljata prehod v razmnoževalnem sistemu proti dvodomnosti pri entomofilnih rastlinah, ki imajo majhne cvetove, mesnate plodove z enim ali nekaj semeni in se razmnožujejo vegetativno, kar bi lahko veljalo tudi za Blagajev volčin.

3.3 SMERNICE ZA NADALJNJE DELO

Čeprav velja Blagajev volčin pri nas za znamenito rastlino, pa je o njegovi biologiji in ekologiji še veliko neznanega. Če sklepamo po navedbah nekaterih avtorjev o evlucijski spremembi rodu *Daphne* proti dioeciji (Roccotiello in sod. 2012, Rodriguez-Perez in Traveset 2011) in podatkih o pojavu ginodiecije pri nekaterih vrstah iz tega rodu (Alonso in Herrera 2001, Shibata in Kudo 2017, Sakata in Nakahama 2018), bi bilo smiselno prisotnost tega pojava preveriti tudi pri Blagajevem volčinu. Brünsteiner (1957) piše, da bi manjšo prisotnost spolnega razmnoževanja pri Blagajevem volčinu na območju Slovenije v primerjavi z osrednjim arealom razširjenosti lahko pripisali ekološkim razlikam. Holubec in Křivka (2006) za *D. glomerata* omenjata razlike v rasti in obliki rastline glede na podlago. Na kislih tleh so rastline ponavadi višje in bolj razvejane, na apnencu pa se rastline plazijo, so manj razvejane in poganjajo iz podzemnih stolonov. Glede na to, da *D. blagayana* v osrednjem arealu raste na serpentinu, v Sloveniji pa na apnencu in dolomitu, bi bila lahko podlaga razlog za razliko v rasti in načinu razmnoževanja med areali. Prav tako bi bilo pri Blagajevem volčinu smiselno preveriti, če je prisoten pojav zamašitve

stigme z lastnim pelodom, kar so opazili pri nekaterih vrstah volčinov (Sakata in Nakahama 2018, Kikuzawa 1989). Oblika, barva in vonj cvetov *D. blagayana* ustrezajo profilu opraševalcev kot so nočni metulji. Ti bi bili morda lahko eni od opraševalcev, kar bi bilo ob natančnejši raziskavi opraševalcev tudi smiselno vzeti v obzir.

4 ZAKLJUČEK

Blagajev volčin je v Sloveniji poleg vegetativnega sposoben tudi spolnega razmnoževanja. Oprašitveni poskusi izvedeni na terenu, ter rezultati P:O razmerja kažejo na to, da je Blagajev volčin najbolj nagnjen h ksenogamiji. Sposoben je tudi proizvodnje avtogamnih in geitonogamnih plodov, vendar sta to precej manj uspešni strategiji opraševanja. Z nastankom plodov iz manipuliranih cvetov ter najdbi plodov drugod na terenu smo ovrgli navedbe, da se plodovi na slovenskih tleh v naravi ne pojavljajo.

5 LITERATURA IN VIRI

- Alonso C. 2004. Early blooming's challenges: Extended flowering season, diverse pollinator assemblage and the reproductive success of gynodioecious *Daphne laureola*. *Annals of Botany* 93: 61–66.
- Alonso C., Herrera C.M. 2001. Neither vegetative nor reproductive advantages account for high frequency of male-steriles in southern Spanish gynodioecious *Daphne laureola* (Thymelaeaceae). *American Journal of Botany* 88(6): 1016–1024.
- Alonso C., Herrera C.M. 2011. Back-and-forth hermaphroditism: Phylogenetic context of reproductive system evolution in subdioecious *Daphne laureola*. *Evolution* 65(6): 1680–1692.
- Aronne G., Russo D., Wilcock C.C. 1996. Pollination Biology of the Rare Perennial *Daphne sericea* Vahl (Thymelaeaceae). *Giornale botanico italiano* 130(1): 519.
- Aronne G., Wilcock C.C. 2006. Reproductive Characteristics and Breeding System of Shrubs of the Mediterranean Region. *Functional Ecology* 8(1): 69–76.
- Barbi S. 2008. Studi di biologia riproduttiva per la conservazione di alcune specie vegetali dell'ambiente mediterraneo e per la valorizzazione di produzioni eco-compatibili. Doktorska disertacija, Università degli Studi di Napoli Federico II, Arboricoltura, botanica e patologia vegetale.
- Batič F., Košmrlj – Levačič B., Martinčič A., Cimerman A., Turk B., Gogala N., Seliškar A., Šercelj A., Kosi G. 2011. Botanični terminološki slovar. Založba ZRC, ZRC SAZU, Ljubljana.
- Brünsteiner T. 1957. Razmnoževanje vrste *Daphne blagayana* v Sloveniji. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- Cruden R.W. 1977. Pollen-Ovule Ratios: A Conservative Indicator of Breeding Systems in Flowering Plants. *Evolution* 31(1): 32–46.
- Cruden R.W. 2000. Pollen grains: Why so many? *Plant Systematics and Evolution* 222: 143–165.
- Dakskobler I., Vončina A., Gantar T. 2011. Rastišče in združbene razmere vrste *Daphne blagayana* v povodju Idrijce. *Hladnikia* 28: 3–16.
- Derganc L. 1902. Geographische Verbreitung der *Daphne blagayana* Freyer. *Allgemeine botanische Zeitschrift für Systematik, Floristik, Pflanzengeographie* 8: 195–197.
- Dermastia M. 2010. Pogled v rastline. Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana.
- Dufay M., Billard E. 2012. How much better are females? The occurrence of female advantage, its proximal causes and its variation within and among gynodioecious species. *Annals of Botany* 109(3): 505–519.
- Feliner G.N. 1996. Growth-form and intraspecific taxonomy in western mediterranean daphne (Thymelaeaceae). *Israel Journal of Plant Sciences* 44(4): 369–379.

- Fišer Pečnikar Ž. 2005. Ocena varstvenega statusa Blagajevega volčina (*Daphne blagayana*) s filogeografsko analizo. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Fujš N. 2015. Ugotavljanje genetske strukturiranosti populacij ozko endemične Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii* March.) s pomočjo prstnih odtisov DNA. Magistrska naloga, Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in infomacijske tehologije.
- Gabrovec M. 1990. Pomen reliefa za geografsko podobo Polhograjskega hribovja. Geografski zbornik 30: 5 – 68.
- Goodwillie C., Kalisz S., Eckert C. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 36: 47–79.
- Halda J.J. 1999. Some taxonomic problems in the genus *Daphne* L. II. Acta Musei Richnoviensis 6: 195 – 233.
- Halda J.J., Haldova J. 2001. The genus *Daphne*. Dobro, Sen.
- Holubec V., Křivka P. 2006. The Caucasus and Its Flowers. Loxia Publishing House, Czech Republic.
- Inouye D.W. 2013. Pollinators, Role of. V: Levin S.A. (ur). Encyclopedia of Biodiversity, Volume 6. Academic Press 6: 140 – 146.
- Jušković M., Vasiljević P.J., Savić A.V., Jenačković D.D., Stevanović B.M. 2017. Comparative morphoanatomical analysis of the leaves and stems of *Daphne* (Thymelaeaceae) species. Biologia 72(7): 709 – 721.
- Kearns C.A., Inouye D.W. 1997. Pollinators, Flowering Plants, and Conservation Biology. Bioscience 47(5): 297 – 307.
- Kikuzawa K. 1989. Floral Biology and Evolution of Gynodioecism in *Daphne kamtchatica* var. *jezoensis*. Oikos 56(2): 196 – 202.
- Kryštufek B. 1999. Osnove varstvene biologije. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana.
- Lavrič B. 2010. Polhograjsko hribovje: planinski vodnik. Planinska zveza Slovenije, Ljubljana.
- Lipovšek M., Dolinar B., Kosec J., Paušič I., Klenovšek D. 2006. Prispevek k pregledu taksonov iz oblikovnega kroga širokolistne močvirnice (*Epipactis helleborine* s.l.). Annales. Series historia naturalis 16(2): 241–252.
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Fischer M.A., Eler K., Surina B. 2007. Mala flora Slovenije. Ljubljana.
- Medrano M., Alonso C., Herrera C.M. 2005. Mating system, sex ratio, and persistence of females in the gynodioecious shrub *Daphne laureola* L. (Thymelaeaceae). Heredity 94: 37–43.

- Omejc J., Brus R. 2005. Varstvo Blagajevega volčina (*Daphne blagayana* Freyer) v gozdnogospodarskem območju Ljubljana. Zbornik gozdarstva in lesarstva 77: 61–83.
- Praprotnik, N. 2004. Blagajev volčin - naša botanična znamenitost. Prirodoslovni muzej Slovenije, Ljubljana.
- Pravilnik o določitvi in varstvu naravnih vrednot. 2004. Ur. l. RS, 111/2004.
- Proctor M., Yeo P., Lack A. 1996. The natural history of pollination. Harper Collins, London.
- Real L. 1983. Pollination biology. Academic press, Orlando, Florida.
- Rdeči seznam praprotnic in semenk, priloga Pravilnika o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. 2002. Ur. l. RS, 82/2002.
- Richards A.J. 1997. Plant Breeding Systems. Chapman & Hall, London.
- Roccotiello E., Casazza G., Cornara L., Moncalvo A., Minuto L. 2012. Reproductive success in *Daphne gnidium* (Thymelaeaceae). Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università di Genova 74: 22–37.
- Roccotiello E., Casazza G., Galli L., Cornara L., Moncalvo A., Minuto L. 2009. The flower biology of *Daphne gnidium* L. (Thymelaeaceae). Plant Systematics and Evolution 279(1): 41–49.
- Rodriguez-Perez J., Traveset A. 2011. Influence of reproductive traits on pollination success in two *Daphne* species (Thymelaeaceae). Journal of Plant Research 124(2): 277–287.
- Sakata Y., Nakahama N. 2018. Flexible pollination system in an unpalatable shrub *Daphne miyabeana* (Thymelaeaceae). Plant Species Biology 33(4): 239–247.
- Shibata A., Kameyama Y., Kudo G. 2017. Restricted female function of hermaphrodites in a gynodioecious shrub, *Daphne jezoensis* (Thymelaeaceae). Journal of Plant Research 131: 245–254.
- Shibata A., Kudo G. 2017. Size-dependent sex allocation and reproductive investment in a gynodioecious shrub. AoB Plants 9(1).
- Shivanna K.R., Tandon R. 2014. Reproductive Ecology of Flowering Plants: A Manual. Springer India, New Delhi, India.
- Strgar V. 1975. O varstvu Blagajevega volčina na Slovenskem. Varstvo narave 8: 67–70.
- Thomson J.D., McKenna M.A., Cruzan M.B. 1989. Temporal Patterns of Nectar and Pollen Production in *Aralia hispida*: Implications for Reproductive Success. Ecology 70 (4): 1061–1068.
- Tutin T.G., Burges N.A., Edmondson J. R., Chater A.O., Heywood V.H., Moore D.M., Akeroyd J.R., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., Newton M.E., Mill R.R. 1993. Flora Europaea. Psilotaceae to Platanaceae. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne.
- Uredba o zavarovanih prosto živečih rastlinskih vrstah. 2004. Ur. l. RS, 46/2004.
- Uredba o zvrsteh naravnih vrednot. 2002. Ur. l. RS, 52/2002.

- Vogler D.W., Kalisz S. 2001. Sex among the flowers: The distribution of plant mating systems. *Evolution* 55(1): 202–204.
- Vukićević D.R., Denić M.S., Janković S.M., Radulović N.S. 2014. The elusive floral scent of *Daphne blagayana* Freyer (Thymelaeaceae). *Natural Volatiles & Essential Oils* 1(2): 45.
- Webb C.J. 1999. Empirical Studies: Evolution and Maintenance of Dimorphic Breeding Systems. V: Geber M.A., Dawson T.E., Delph L.F. (ur). *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Springer: 61–95.
- Willmer P. 2011. *Pollination and floral ecology*. Princeton University Press, Princeton.
- Wraber T. 1964. Nekaj misli o varstvu narave, posebej še rastlinstva. *Varstvo narave* 2–3: 75–88.
- Wraber, T. 2004. Nada Praprotnik: Blagajev volčin - naša botanična znamenitost. Fotografija Ciril Mlinar. *Hladnikia* 17: 61–62.

PRILOGA A: Slovar.

Agamospermija: nastanek semen brez oploditve, pri čemer se embrio razvije iz različnih delov semenske zasnove ali ženskega gametofita brez zlitja spolnih celic.

Alogamija (sinonim: navzkrižna oploditev): v različnih literaturnih virih najdemo različne razlage tega termina. Botanični terminološki slovar navaja, da gre pri alogamiji za oploditev, pri kateri se združita moška in ženska gameta dveh genetsko različnih osebkov. Shivanna in Tandon (2014) pa navajata, da gre pri alogamiji za prenos peloda z enega cveta na drugega ne glede na to, ali pelod izvira z iste ali druge rastline.

Avtogamija (sinonim: sámoploditev): spolno razmnoževanje, pri katerem se združita gameti, ki izvirata od osebkov istega genotipa.

Dihogamija: nesočasno dozorevanje prašnikov in brazd v istem cvetu, s čimer se onemogoča samooprašitev.

Geitonogamija: vrsta oprašitve, pri katerem se pelod enega cveta prenese na brazdo pestiča drugega cveta istega osebka.

Herkogamija: prostorska ločenost prašnikov in brazd pestiča, ki so v dvospolnem cvetu nameščeni tako, da so brazde nad prašniki ali pod njimi, s čimer se onemogoča samooprašitev.

Kleistogamija: opraševanje, pri katerem se pelod prenese na brazdo pestiča istega cveta, ki se med cvetenjem ne odpre.

Ksenogamija (sinonim: navzkrižno opraševanje): opraševanje, pri katerem se pelod enega osebka prenese na brazdo pestiča drugega osebka.

Locus classicus: nahajališče, na katerem se določena vrsta prvič nabere in opiše v floristični literaturi.

Protandrija: dihogamija cvetov, v katerih najprej dozori prašniki, pestiči pa po njihovem propadu.

Protoginija: dihogamija cvetov, v katerih najprej dozori pestiči, prašniki pa po oploditvi.
Petalóiden: podoben venčnim listom.

Simpodialno socvétje: socvetje glede na nastanek in razraščanje socvetnih osi, pri katerem se vsakokratna socvetna os konča s cvetom, nadaljnja rast pa poteka s stranskimi poganjki