

Slovarček:

C-vrednost. Količina DNA v haploidnem genomu organizma, izražena v pikogramih.

Citogenetika. Študij kromosomov.

Eritrociti. Rdeče krvne celice.

Levkociti. Bele krvne celice.

Mitogen. Molekula, ki spodbudi celično delitev oziroma mitozo.

Proliferacija celic. Razmnoževanje celic s celičnimi delitvami.

Trombociti. Krvne ploščice, pomembne za strjevanje krvi.

Viabilnost celic. Delež živih celic.

Literatura:

Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., Fenoglio, C., 2007: *Evaluation of Rana snk esculenta blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. Aquatic toxicology*, 81: 45-54.

Bizjak Mali, L., Bulog, B., 2011: *Follicular ovarian atresia in the olm (Proteus anguinus anguinus)*. In: *Societa Italiana Scienze Microscopiche (Ed.), Proceedings of 10th Multinational Congress on Microscopy, 4-9-September, 2011, Urbino, Italy, 295-296*.

Bizjak Mali, L., Bulog, B., 2015: *The morphology of male gonads of the neotenic salamander (Proteus anguinus)*. *FASEB Journal*, 29 (1): 10.

Gregory, T. R., 2001: *The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. Blood cells, molecules and diseases*, 27 (5): 830-843.

Juberthie, C., Durand, J., Dupuy, M., 1996: *Là reproduction des protéés (Proteus anguinus) bilan de 35 ans d'élevage dans les grottes-laboratoires de moulis et d'aulignac. Mémoires de Biospéologie, Tome XXIII: 53-56*.

Ross, L. G., Ross, B., 2008: *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3rd ed. Oxford: Blackwell publishing, 222 str.*

Sessions, S. K., 1980: *Evidence for a highly differentiated sex chromosome heteromorphism in the salamander Necturus maculosus (Rafinesque)*. *Chromosoma*, 77: 157-168.

Sessions, S. K., Bizjak Mali, L., Green, D.

M., Trifonov, V., Ferguson-Smith, M., 2016: *Evidence for Sex Chromosome Turnover in Proteid Salamanders. Cytogenetic and Genome Research, DOI: 10.1159/000446882 (v tisku)*.

Zgodbe o močvirnicah – rod (genus) *Epipactis* (prvi del) • Botanika

Zgodbe o močvirnicah – rod (genus) *Epipactis* (prvi del)

Matej Lipovšek

Raznolikost pri močvirnicah iz rodu *Epipactis* ni nenavadna. Odstopanja v morfoloških lastnostih nekaterih vrst so tako očitna, da ne moremo govoriti o močvirnici v ožjem pomenu vrste – sensu stricto (s. s.). To velja predvsem za mnoge neopredeljene močvirnice, ki so podobne širokolistni močvirnici (*Epipactis helleborine*). Takšno morfološko odstopajočo močvirnico uvrščamo v oblikovni krog izhodiščne širokolistne močvirnice (*Epipactis helleborine* s. s.) in jo opredelimo kot širokolistno močvirnico v širšem pomenu – sensu lato (s. l.), torej *Epipactis helleborine* s. l.

Morfološke raziskave teh močvirnic so pokazale, da posamezne taksone ne moremo označiti le kot variabilne ali kot podvrsto izhodiščne močvirnice. Poimenovanje nekaterih močvirnic iz oblikovnega kroga širokolistne močvirnice je zato olajšalo pregled v sistematiki, a ob tem so vendar ostali pomisleki o utemeljenosti poimenovanja. V botaničnih ključih različnih avtorjev ne vidimo dosledne hierarhične opredelitve. Nekatere močvirnice so označene kot svoja vrsta, te iste pa drugje kot podvrsta ali pa le z oznako *Epipactis helleborine* s. l. Helmut Presser, avtor knjige *Orchideen* (Presser, 2002), na primer sploh ne omenja močvir-



Cvet širokolistne močvirnice (*Epipactis helleborine* s. s.). Foto: Matej Lipovšek.

nice *Epipactis latina*, ki jo poznamo v Sloveniji in kaže izrazito podobnost s širokolistno močvirnico. Kako bi si drugače razlagali obstoj več kot 50 vrst močvirnic, ki jih opisuje Pierre Delforge v knjigi o orhidejah (Delforge, 2006)? Določa jih namreč na podlagi morfoloških kriterijev, ki so različni in po njegovem opravičujejo tako obsežno število močvirnic. Mnogi drugi avtorji pa priznavajo manjše število vrst in so do opredelitve nekaterih vrst kritični. Kretzschmar (Kretzschmar, 2013) navaja, da so obstoječe

morfološke razlike vendar premajhne, število vrst pa ne more biti tako obsežno, ker se mnoge med seboj podobne močvirnice nahajajo v geografsko ozkih območjih. V nekaterih primerih gre le za en takson, ki šteje nekaj ducat rastlin na majhnem območju. Botaniki se na terenu opirajo na tradicionalne metode, ki temeljijo na morfoloških razlikah. Le tem nekateri ostajajo zvesti. Opredelitev pa je otežena zaradi vpliva okoljskih dejavnikov, razvojne stopnje rastline in omenjenih razhajanj v taksonomskem

določevanju med avtorji. V zadnjih dvajsetih letih je z razvojem molekulskih analiz prišlo do obsežnih sprememb v sistematiki rastlin na različnih taksonomskih ravneh. Kar precej sprememb so v družino orhidej vnesli britanski raziskovalci (Bateman, 2001; Hollingsworth) z uporabo različnih molekulskih označevalcev. Z molekulskim pristopom se je na podlagi preučevanja genetske podobnosti spremenila sistematika nekaterih orhidej v rodovih te družine. V rodu močvirnic (*Epipactis*) pa je molekulska sistematika precej nedovršena. Težave so v tem, da je bilo v Evropi le malo novo odkritih močvirnic predmet genetskih raziskav. Te so pokazale, da se posamezne močvirnice znotraj ožje populacije genetsko zanesljivo razlikujejo. To spoznanje dopušča predpostavko o skupni predhodnici močvirnic, ki bi jo lahko imenovali prastara *Epipactis helleborine*. Skozi obdobja in ob kopičenju mutacij so se razvile nove, največkrat avtogamne vrste. Kdaj in kako so se posamezni rodovi in vrste znotraj rodu *Epipactis* ločile, bomo lahko jasneje opredelili s kombinacijo različnih molekulskih analiz, predvsem analiz plastidne DNA in ITS. Močvirnice so se prilagodile krajevnim okoliščinam in razmeram na rastišču, ki za širokolistno močvirnico v sedanjem obdobju ne bi bili primerne. Današnja sistematika močvirnic ni najbolj primerna predvsem zato, ker na podlagi dosedanje literature večina vrst še ni genetsko opredeljena, da bi lahko zanesljivo sklepali na genetsko sorodnost med taksoni.

In kako gledamo na močvirnice pri nas zdaj?

Naslednje zgodbe o posameznih močvirnicah na Slovenskem opisujejo težave, s katerimi se pogosto srečujemo.

1. Zgodba o Leutejevi močvirnici (*Epipactis leutei*)

Karl Robatsch in Michael Perko sta leta 1989 objavila širokolistni močvirnici podobno novo vrsto, ki jo je Robatsch imenoval po dr. Gerfriedu H. Leuteju. Ta, Leutejeva

močvirnica, se nahaja na pobočju Malega Obirja na Koroškem. V osemdesetih letih sta enako močvirnico našla Vlado Ravnik in Karl Robatsch tudi na trentarskem pobočju Vršiča. Od takrat avtorji navajajo, da se Leutejeva močvirnica nahaja na avstrijskem Koroškem in v območju Triglavskega narodnega parka. Pri nas je v naslednjih letih nismo več našli. Zaman so jo poskušali najti različni botaniki. Ravnik sam pove, da se je vračal na trentarsko pobočje Vršiča, a je tam ni bilo več. Ko je zbiral podatke za knjigo *Orhideje Slovenije* (Ravnik, 2002), mu je Michael Perko iz Celovca posredoval fotografijo Leutejeve močvirnice. V knjigi *Kukavičevke v Sloveniji* pa Branko Dolinar (2015) predstavlja Leutejevo močvirnico kot podvrsto širokolistne močvirnice (*E. helleborine* subsp. *leutei*). Opisuje jo predvsem v alpskem fitografskem območju Slovenije. Po njegovem naj bi bili vprašljivi podatki o pojavljanju te močvirnice zunaj alpskega območja. To morda velja za odkritje neznane močvirnice na dveh krajih v območju Senovega (Marina in Tadeja Brinovec), ki je bila kasneje opredeljena kot *Epipactis leutei* (Lipovšek, 2009). Dvom o takšni opredelitvi so kasneje izrazili nekateri poznavalci močvirnic (Jože Kosec, Stefan Hertel, Roko Čičmir). Italijanski botaniki (Perazza, Lorenz, 2013) enačijo Leutejevo močvirnico z vrsto *E. leptochila* subsp. *neglecta*, Jogan (2007, str. 767) navaja, da je taksonomski položaj nejasen in da ne gre za samostojno vrsto, ampak kvečjemu podvrsto. Velika težava je tudi zaradi podobnosti med Leutejevo močvirnico iz njenega klasičnega rastišča in močvirnicami, ki rastejo pri nas. Ta podobnost je lahko zavajajoča. Zato smo leta 2014 pričeli z morfološkimi in genetskimi primerjavami senovske Leutejeve močvirnice s prvotno objavljeno Leutejevo močvirnico pod Malim Obirjem na njenem klasičnem rastišču na avstrijskem Koroškem.

Ob tem se je na terenih v Sloveniji in na Koroškem v Avstriji pokazala dodatna zanimivost. Ob času cvetenja *Epipactis leutei* je



Cvetova Leutejevih močvirnic (*Epipactis leutei*): levi cvet je iz Avstrije, desni iz Slovenije. Foto: Matej Lipovšek.

na Koroškem in pri nas v bližini Leutejeve močvirnice zacvetela izjemno podobna močvirnica, ki se je razlikovala le po krajšem epihilu, ki tvori prednji del medene ustne. Ostali morfometrični podatki teh močvirnic so bili enaki.

V upanju, da bodo genetske raziskave pripomogle k vprašanju, ali obstaja Leutejeva močvirnica na Slovenskem, smo poleg vzorcev Leutejeve močvirnice iz avstrijske Koroške in Slovenije analizirali tudi vzorec (stebelni list) Leutejeve močvirnice iz Madžarske. Rezultati so pokazali ujemanje vseh treh močvirnic iz Avstrije, Madžarske in Slovenije pri pretočni citometriji, ožjo sorodnost pri analizi regije ITS in odstopanja pri oceni AFLP. Šele na podlagi molekularskih analiz, v katere bomo vključili Leutejeve močvirnice z vseh rastišč v Sloveniji, bomo zanesljivo potrdili njihov obstoj v Sloveniji.

2. Zgodba o Voethovi močvirnici (*Epipactis voethii*)

To nežno in gracilno močvirnico je odkril Walter Vöth na območju Bisamberg severno od Dunaja leta 1993. Objavil in poimenoval po gospodu Vöthu pa jo je Karl Robatsch (Robatsch, 1993). Nova odkritja Voethove močvirnice so bila na Gradiščanskem (Günser Gebirge), kasneje pa so prihajala poročila o njenem odkritju iz Češke, Madžarske in Hrvaške. Branko Dolinar je bil prvi, ki je domneval njen obstoj že pred dobrim desetletjem na Goričkem. In potem jo je našel še na Srebrnem bregu ter kasneje v Godenincih blizu Središča ob Dravi. Pri določanju močvirnice sem sodeloval in smo jo nato objavili v *Proteusu* (Lipovšek, 2009). Veselje, da imamo tudi pri nas to močvirnico, ni dolgo trajalo. Kmalu po objavi je prišlo do dvomov o obstoju Voethove močvirnice na Goričkem in v Godenincih. Kako smo jo sploh določili? Na voljo smo imeli opise



Voethovi močvirnici (Epipactis voethii): leva iz Madžarske, desna iz Slovenije. Foto: Matej Lipovšek.

in slikovne priloge, ki so ponujali primerjave. Morfološke značilnosti »naše« Voethove močvirnice so ustrezale prvotnim opisom. Kasneje smo videli, da se zatika pri opisu cvetnih struktur, ki jih je možno analizirati le s stereolupo. Češki orhidolog Petr Batoušek je objavil podrobnosti, ki jih na terenu tudi z navadno lupo ni bilo možno oceniti (Batoušek, Kežlinek, 2012). V sklopu naših raziskav smo pod stereolupo natančneje preučili zgradbo stebriča znotraj cveta (glej pomen izrazov). Ta meri v eno ali drugo smer nekaj milimetrov in podrobnosti na teh razdaljah s prostim očesom zlahka uidejo pozornosti. Stebriči različnih močvirnic se razlikujejo in ta razlika pripomore k določanju posameznega taksona. Po Batoušku naj bi merjenje določenih parametrov na stebriču olajšalo razvrščanje vrst, podvrst ali njim podobnih močvirnic. Te podrobnosti Batoušek tudi jasno opredeljuje s skicami in jih uporablja v ključu za nekatere taksona, med

drugim jasno opredeljuje značilnosti stebriča Voethove močvirnice. Po izkušnjah, ki smo si jih pridobili, pa se je pokazalo, da kljub nekaterim statistično značilnim razlikam značilnosti struktur stebriča in nekaterih cvetnih parametrov niso dovolj zanesljive pri dokončni opredelitvi posameznega taksona. Nadejali smo si, da bi pomoč poznavalca na rastišču na Goričkem pomembno vplivala na nadaljnje razjasnitve. Hrvaški orhidolog Roko Čičmir je že leta 2011 ob obisku na Srebrnem bregu dejal, da taksoni z »našo« oceno Voethove močvirnice niso nič drugega kot taksoni iz oblikovnega kroga širokolistne močvirnice. Enako je menil tudi Stefan Hertel iz Nemčije, ki si je ogledal rastline in rastišča leta 2013. Ostala je še ena pot. Odločili smo se za genetske analize in primerjali Voethovo močvirnico iz Madžarske z domnevno Voethovo močvirnico na Goričkem. Pomoč na Madžarskem je ponudil naravovarstvenik biolog Ovari

Miklos, ki je tudi skrbnik v naravnem rezervatu ob Blatnem jezeru. Podoba »prave« Voethove močvirnice na Madžarskem se ni očitno razlikovala od »naše« na Goričkem. Pretočna citometrija in regija ITS nakazuje sorodnost, vendar na hierarhičnem nivoju širokolistne močvirnice raziskave kažejo premalo podpore. Z analizo AFLP in kloroplastne DNA si v prihodnjem letu ob primernem številu vzorcev s slovenskih, madžarskih in avstrijskih nahajališč obetamo razjasniti obstoj Voethove močvirnice na Slovenskem.

3. Zgodba o močvirnicah z Goričkega

Pogosto sem se spraševal, kakšno močvirnico imam pred seboj. Določanje znanih in morfološko nezmotljivih močvirnic ni skoraj nikoli delalo težav. Pri vseh, kjer je prevladovala zelena barva z več ali manjšimi odtenki rdečkaste barve, je bila zgodba pogosto drugačna. Podobnost s širokolistno močvirnico je bila lahko izrazita, a neredko tako drugačna, da sem mislil na neko vrsto, ki bi jo veljalo raziskati. Na Goričkem smo vrsto let sledili različnim močvirnicam in tam jih je kar nekaj, ki so nam delale preglavice zaradi gracilne zgradbe, majhne rasti, cvetov, ki niso spominjali na »heleborinski« izvor, ali celo zaradi neverjetno lepe barvitosti. Slednja sicer pri širokolistni močvirnici ni redka, a vedno zbuja pomisleke o morebitni različici osnovne vrste.

Poleti leta 2013 sem povabil priznanega nemškega orhidologa Stefana Hertla v Slovenijo in mu med drugim pokazal različne močvirnice. Zanimiv je odziv strokovnjaka, ki ima »evropski pregled« nad močvirnicami. Z odgovori ni bil hiter. Hodila sva od enega do drugega rastišča in videl sem, da je bil navdušen nad bogato izbiro na pogled različnih taksonov. Stala sva nedaleč od ceste pred skupnico petih močvirnic, ki so se po moji oceni razlikovale po stebelnih listih, višini, barvi in socvetjih. Bile so rahlocvetne, gostocvetne in vse na območju nekaj kvadratnih metrov. Na moje vztrajno

vprašanje, kam sodijo, je odgovoril: »Če že hočeš, vse te sodijo v oblikovni krog širokolistne močvirnice *Epipactis helleborine* s. l.« Sprva mu nisem odgovoril, nato pa le pripomnil: »Kaj praviš, če bi z genetskimi analizami poskušali najti razlike ali skupne parametre, ki bi pokazale ...?« »Kaj misliš, da bi pokazale?« je odvrnil. »Le poskusi in vesel bom odgovora, kakršenkoli že bo.«

Dve leti smo se trudili z genetskimi analizami. Odgovori so prihajali počasi, a ponudili so drugo razlago. Pokazalo se je, da na Goričkem cvetijo trije genetsko različni taksoni, ki ne sodijo k širokolistni močvirnici v ožjem smislu (*Epipactis helleborine* s. s.) (Ivanuš, Šiško, Urbanek Krajnc, Luthar, Šuštar, Lipovšek, 2014). Stefan Hertel je imel prav, a morda le začasno, saj bodo šele prihodnje molekulske in klasične analize pripomogle k razjasnitvi njihove taksonomske pripadnosti. Stefanu sem sporočil, odgovora nisem prejel, a mislim si, da se je namuznil, ko je prebiral moj odgovor ...

4. Zgodba o ozkoustni močvirnici (*Epipactis leptochila*)

Igor in Andrej Paušič sta pridno botanizirala že v otroških letih. Nedaleč od njune domačije v Lendavskih gorica se proti madžarski meji razprostira neokrnjeni Redički bukov gozd. Na tem obmejnem območju ni bilo posegov v naravo in tudi v gozd je le redko kdo zahajal. Pred mnogimi leti sta Paušiča v tem gozdu našla nenavadno močvirnico, ki je nista znala uvrstiti. Igor me je povabil, da si jo ogledam. Vabila sem bil vesel in ko sem močvirnico videl, je bilo jasno, da je nekaj posebnega. Šlo je za ozkoustno močvirnico, ki pa se je nekoliko razlikovala od enake močvirnice s pobočij Lisce. Na Lisci smo takrat, zahvaljujoč Dušanu Klenovšku, poznali edino zanesljivo rastišče ozkoustne močvirnice. Razlika med tema taksonoma je bila v obliki prehoda na medeni ustni. Prehod iz zadnjega režnja medene ustne (hipohil) v prednji režen medene ustne (epihil) je bil pri močvirnici na



Ozkoustne močvirnice (Epipactis leptochila) v Trnovskem gozdu. Foto: Matej Lipovšek.



Cvet ozkoustne močvirnice (Epipactis leptochila). Foto: Matej Lipovšek.

Lisci ožji kot tisti pri lendavski močvirnici. Zato sem nekaj časa celo menil, da bi lahko šlo za podvrsto ozkoustne močvirnice. Za pomoč sem prosil poznavalca Adolfa Riechelmana iz Nemčije, ki mi je po pregledu poslanih slik lendavske močvirnice odgovoril, da bi šlo lahko za podvrsto, opisano s strmin pod Učko v Istri (*Epipactis leptochila* subsp. *dinarica*). Nenavaden zadetek, sem premišljeval, to pa je pomenilo, da morava z Igorjem na Učko. Res nama je uspelo, pravzaprav Igorju, ki je našel omenjeno podvrsto ozkoustne močvirnice na kvarnerski strani pod vrhom cestnega prelaza na Učki. Takrat nama je postalo jasno, da lendavska močvirnica ni enaka močvirnici na Učki. Nadaljnja razjasnitev med tema taksonoma je morala počakati nekaj let, dokler nismo pričeli z genetskimi raziskavami. Te pa so leta 2013 pokazale, da sta močvirnici na Lisci in v Lendavskih goricah genetsko sorodni. Vendar to še ni bilo vse. Istega leta 2013 me je Jože Kosec peljal na Gorjance, kjer mi je na Krvavem kamnu pokazal tretje rastišče ozkoustne močvirnice. Tam je cvetelo približno pet ali šest močvirnic in vse

so nesporno pripadale ozkoustni močvirnici. Jože mi je zaupal še eno rastišče enake močvirnice v Trnovskem gozdu. Preteklo je leto, preden smo se v majhni skupini idrijskih ljubiteljskih botanikov odpravili na Lokve v Trnovskem gozdu. Tam sta mi Anka Vončina in Rafko Trpin pokazala rastišče ozkoustne močvirnice, ki je kazala nezmotljive značilnosti tega taksona.

Nedaleč naprej je Rafko pokazal še eno rastišče pred krajem Predmeja, a je precej deževalo in utegnil sem vzeti le vzorce za laboratorijske raziskave. In kaj so pokazale genetske preiskave? V moje veliko veselje so se rezultati raziskav pretočne citometrije, ITS in AFLP pri vseh vzorcih ujemali med seboj. Takšnega ujemanja med ozkoustnimi močvirnicami na podlagi morfoloških značilnosti in genetskih raziskav do zdaj pri drugih močvirnicah nismo našli. Tu so bile genetske raziskave res v pomoč, da sem prišel obstoju ozkoustne močvirnice na različnih rastiščih do dna.

(Se nadaljuje v naslednji številki.)