

Streszczenie

Gatunki z rodzaju wiesiołek (*Oenothera* L., Onagraceae) należą do allochtonicznych elementów flory Europy Środkowej. Rodzaj ten obejmuje gatunki o różnym stopniu zadomowienia oraz częstości występowania (rzadkie, częste, a nawet inwazyjne; Mihulka i in. 2003; Rostański i in. 2010). Wkraczanie i rozprzestrzenianie gatunków obcych jest uznawane za jedno z największych zagrożeń dla różnorodności biologicznej w skali globalnej, m.in. ze względu na zakłócanie interakcji roślina-owad oraz destrukcyjny wpływ na różnorodność gatunkową flory (Ricciardi i in. 2013). W Polsce występuje ok. 60 gatunków *Oenothera*. Kwiaty tych gatunków charakteryzują się bogactwem form morfologicznych (np. długość hypancjum, kolor i wielkość płatków korony), jednocześnie uważane są za obligatoryjnie wyspecjalizowane (nocna anteza, nocne zapylacze długojęzyczkowe; Raven 1988; Wasser i Ollerton 2006), ale relacje tych roślin z rodzimą entomofauną nie zostały do tej pory określone. Celem podjętych badań była ocena biologii kwitnienia i ekologii zapylania pięciu gatunków z rodzaju *Oenothera* tj.: *O. casimiri* Rostański, *O. flaemingina* Hudziok, *O. nuda* Renner ex Rostański, *O. paradoxa* Hudziok, *O. rubricaulis* Kleb. Określano również skład entomofauny wizytującej kwiaty, ich efektywność w transporcie pyłku oraz definiowano system reprodukcyjny. Badania prowadzono w latach 2013 - 2015 na terenie Ogrodu Botanicznego UMCS w Lublinie. W badaniach szczegółowych zastosowano standardowe metody: (i) obserwacje terenowe (długość kwitnienia, spektrum entomofauny), (ii) mikroskopia świetlna, elektronowa (struktura tkanki sekrecyjnej; badanie ładunku pyłku przenieszonego przez entomofaunę), (iii) metody laboratoryjne (masa nektaru - metoda pipetowa, refraktometryczna; cechy jakościowe nektaru - wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), zawartość białka - metoda Bradforda; masa produkowanego pyłku - metoda eterowo-wagowa, zawartość białka - metoda Kjeldahla). System reprodukcyjny określano w oparciu o kontrolowane kombinacje zapylania (m.in. samoczynne samozapylenie, indukowane oraz spontaniczne zapylenie krzyżowe). Wyniki opracowano statystycznie (m.in. ANOVA, test *post-hoc* Tukeya; test Kruskala-Wallisa; $P = 0,05$)

W warunkach klimatycznych Polski południowo-wschodniej, kwitnienie gatunków z rodzaju *Oenothera* rozpoczyna się w połowie lub pod koniec czerwca i trwa do końca lipca lub połowy sierpnia; sezonowa sekwencja kwitnienia gatunków powtarza się rokrocznie. Badane gatunki *Oenothera* cechuje wysoce specjalistyczny sposób otwierania kwiatów, tj. w późnych godzinach wieczornych (20:00 - 21:00). Kwiaty pozostają w antezie do godzin

wczesno porannych (tj. 7:00 - 9:00), co skutkuje krótką antezą pojedynczego kwiatu, trwającą ok. 10 godzin.

Kwiaty *Oenothera* produkują nektar oraz pyłek jako nagrodę kwiatową, a prezentacja nagrody (dostępność dla potencjalnych zapylaczy) trwa od początku antezi do końca życia kwiatu. Nektar kwiatowy produkowany jest w tkance wydzielniczej, zlokalizowanej u podstawy wydłużonego, cylindrycznego hypancjum. Tkanka nektarnika utworzona jest z jednej warstwy komórek epidermalnych, kilku warstw komórek subsekrecyjnych (9-14) oraz ze zlokalizowanego poniżej miękiszu zasadniczego. Na powierzchni nektarnika obserwuje się liczne zmodyfikowane aparaty szparkowe, przez które nektar jest aktywnie wydzielany do środowiska zewnętrznego. Masa wydzielanego nektaru jest cechą gatunkową, zaś koncentracja cukrów w nektarze nie różni się istotnie pomiędzy taksonami i wynosi średnio 27,8 %. Nektar produkowany jest w dużych ilościach (średnio 20,8 mg/kwiat), a największą kumulację nektaru obserwuje się w godzinach wczesno porannych. Nektar zawiera sacharozę, glukozę i fruktozę, jednak dominującym węglowodanem nektaru jest sacharoza. Nektar *Oenothera* zawiera licznie aminokwasy białkowe i niebiałkowe, a cechą wspólną dla wszystkich gatunków jest całkowity brak proliny. Proporcje poszczególnych węglowodanów, aminokwasów oraz białka różnią się znacząco pomiędzy *Oenothera*, ale nie wpływa to na zróżnicowanie składu entomofauny wizytującej kwiaty.

Masa produkowanego pyłku w kwiatkach różni się pomiędzy gatunkami *Oenothera*, zależy od wielkości pylników i jest zmienna w zależności od fazy fenologicznej kwitnienia. Największe pylniki oraz największą masę produkowanego pyłku obserwuje się na początku i w pełni kwitnienia, zaś wraz z postępującym kwitnieniem wielkość pylników oraz masa produkowanego pyłku spada. Zawartość procentowa białka w suchej masie pyłku *Oenothera* różni się znacząco pomiędzy badanymi gatunkami (*O. paradoxa* 17,7%, *O. casimiri* 13,6%), średnio wynosi 15,4%).

Pora otwierania kwiatów, pora prezentacji nagród kwiatowych oraz dynamika kumulacji nektaru powoduje, że gatunki *Oenothera* przywabiają zarówno nocną jak i dzienną entomofaunę (w sumie 10 gatunków). W każdym sezonie wegetacyjnym najliczniejszą grupą owadów wizytujących kwiaty *Oenothera* były nocne motyle w rodziny Noctuidae, stanowiąc ponad 50% wszystkich wizyt owadów. Nocne motyle nie przyczyniają się do zapylenia kwiatów *Oenothera*, a największy ładunek pyłku *Oenothera* przenoszony jest na powierzchni ciała pszczoły miodnej oraz trzmieli.

Receptywność znamion słupka rozpoczyna się w stadium paku, wraz z początkiem dostępności pyłku i trwa do końca życia kwiatu. Badane gatunki są samozgodne,

a samozapylenie jest dominującą strategią reprodukcyjną. Do samozapylenia może dochodzić zarówno w sposób samoczynny tuż przed rozpoczęciem antezi, jak również przy udziale owadów wizytujących w czasie trwania antezi. System reprodukcyjny nie różni się pomiędzy gatunkami *Oenothera* niezależnie od częstości ich występowania/frekwencji. Badane gatunki cechuje wysoki potencjał do mieszanego systemu reprodukcyjnego, zaś samozapylenie w znaczącym stopniu może przyczynić się do zapewnienia sukcesu reprodukcyjnego w warunkach braku zapylaczy.

Gatunki z rodzaju *Oenothera* charakteryzuje wysoka wydajność cukrowa i pyłkowa, która wynosi przeciętnie 25,4 g cukrów/1 m² oraz 21,1 g pyłku/1 m², dlatego gatunki te mogą być uznane za źródło pokarmu dla owadów wizytujących, w tym dzikich zapylaczy. Jednak konstruując pastwiska dla owadów należy uwzględniać cechy jakościowe pożytku, np. niską zawartość białka w pyłku. Ponadto, mając na uwadze wysoki potencjał badanych gatunków do wkraczania na nowe siedliska i/lub dokonywania inwazji w nowych fitocenozach, istotne jest zachowanie dobrych praktyk ogrodniczych podczas ewentualnego podsiewania gatunków *Oenothera* na pastwiskach pszczelich, aby wyeliminować i/lub ograniczyć niekontrolowane przenikanie tych gatunków do środowiska przyrodniczego.

Abstract

The species of *Oenothera* (evening primroses, Onagraceae) are alien in Central European flora. These species have differences in the distribution and frequency status in Europe, including rare, common or even invasive taxa (Mihulka et al. 2003; Rostański et al. 2010). The spread of alien plant species is recognized as a main threat for a global biodiversity, plant-insect interactions and diversity of native flora (Ricciardi et al. 2018). In Poland, about 60 *Oenothera* taxa have been reported. The genus *Oenothera* is characterized by an extremely high species diversity with disparity in flower morphology (e.g. hypanthium length, color and size of petals), but simultaneously, flowers are considered obligatory specialized (nocturnal anthesis and long-tongued pollinators; Raven 1988; Wasser and Ollerton 2006); however, the relationships of these species with native entomofauna have not been defined. The present work was undertaken to study blooming biology and pollination ecology of five *Oenothera* species, i.e.: *O. casimiri* Rostański, *O. flaemingina* Hudziok, *O. nuda* Renner ex Rostański, *O. paradoxa* Hudziok, *O. rubricaulis* Kleb. Experiments on breeding systems as well as observations of spectrum and behaviour of floral visitors were also performed, including analysis of the most effective pollen vectors (i.e. putative pollinators). The survey took place in the Botanical Garden of the Maria Curie-Skłodowska University in Lublin in 2013-2015. The complex studies were performed using following methods: (i) field observations (duration of blooming, spectrum of entomofauna), (ii) light and electron microscopy (structure of secretory tissues, pollen load analyses), (iii) laboratory experiments (mass of nectar - micropipette method, refractometer; quality of nectar - high pressure liquid chromatography (HPLC), protein quantity - Bradford method; pollen production - ether method, protein concentration - Kjeldahl method). The breeding system was studied by dividing flowers into five different pollination treatments (e.g. spontaneous self-pollination, induced and spontaneous cross-pollination). Statistical analyses were applied (e.g. ANOVA, HSD Tukey test, Kruskal-Wallis test; $P = 0.05$).

Each year, the flowering seasons of *Oenothera* species begin in the middle or late June and last until late July or mid-August. Flowers of all species exhibited nocturnal anthesis; i.e., the flowers of *Oenothera* open specifically late in the evening, i.e., 20:00 - 21:00, and lasted until early morning, i.e., 7:00 - 9:00. Therefore, the anthesis of a single flower is short and lasts c.a. 10 hours.

The flowers of the investigated *Oenothera* produce both pollen and nectar as floral rewards; the presentation of floral rewards (i.e. availability for potential pollinators) lasts from the beginning of the anthesis until the flower senescence. Floral nectar is exuded by secretory

structures (nectaries) that are located at the base of a long, tubular hypanthium. The secretory tissue is composed of a single-layered epidermis, several layers (9-14) of nectary parenchyma cells and ground parenchyma. Numerous, densely distributed and mature stomata are noted on the surface of the nectary, and the nectar in *Oenothera* is released via nectarostomata. The mass of nectar produced is a species-specific feature. Nectar sugar concentration is relatively low (c.a. 27.8%) and does not vary among *Oenothera*. A single flower produces relatively large volumes of nectar (c.a. 20.8 mg/flower), and the highest accumulative nectar production is observed in the early morning hours. The nectar of *Oenothera* is sucrose-dominant, and composed mainly of sucrose, glucose and fructose. A great variety of amino acids, including both protein and non-protein types, is detected in the nectar profile of investigated taxa. The complete absence of proline in the nectar amino acid profile is characteristic for all species examined. The nectar carbohydrate composition, concentration of nectar amino acids and protein content differ among studied *Oenothera*. However, these differences in nectar chemistry among studied *Oenothera* do not impact on the diversity of floral entomofauna attracted.

The mass of pollen produced is species-specific and is correlated with the size of anthers. Moreover, blooming phase has an impact on the size of anthers and/or mass of pollen produced per flower in all *Oenothera* species. The largest anthers and greatest pollen production are observed at the beginning and/or during full blooming phase, and together with progress of flowering the values decrease significantly at the end of the blooming phase. The average protein content of pollen grains is low and differs between *Oenothera* species; the highest protein content is observed in the pollen of *O. paradoxa* (c.a. 17.7%), whereas the lowest in pollen of *O. casimiri* (c.a. 13.6%).

The flowers of all *Oenothera* attract both nocturnal and diurnal entomofauna. This is due to specific time of flower opening, presentation of floral rewards as well as nectar accumulation. For all study seasons, most floral visits to *Oenothera* were made by nocturnal Lepidoptera from Noctuidae family. Indeed, the proportion of visits made by lepidopterans to any individual *Oenothera* species considerably exceed 50% of all insect visits. Nevertheless, these insects do not contribute to the pollination of *Oenothera*, and the highest pollen loads are observed on the body of honeybees and bumblebees.

Field tests showed that receptivity in the stigma commences prior to anthesis; the stigmas are receptive at bud stage (approx. 24 h before anthesis) and remains receptive until the end of anthesis. All *Oenothera* investigated are self-compatible, and self-pollination is a main reproductive strategy in those species. Self-pollination may either take place autonomously at the final bud stage (just before the flowers opened) or may be mediated by insects during the

anthesis. The breeding systems do not vary between *Oenothera* studied, irrespectively of their frequency status. The *Oenothera* examined have a great potential for a mixed mating system, whereas self-pollination may ensure autonomous reproductive advantage, especially when pollinators are scarce.

The *Oenothera* studied may be considered valuable nectar sugar (25.4 g of sugars/1 m²) and pollen (21,1 g of pollen/1 m²) yielding plants for visiting entomofauna, including wild pollinators. However, it is suggested to take into account quality features of floral rewards (e.g. low pollen protein content) during formation of new bee pastures for pollinators. Moreover, considering the invasive potential of *Oenothera*, sustainable horticultural management and precautions are suggested in order to prevent uncontrolled spread of these species into new areas, in the case of planned cultivation or introducing these plants into bee pastures.