

Stan zachowania krytycznie zagrożonego gatunku *Gladiolus paluster* (Iridaceae) w Polsce – analiza zmienności genetycznej osobników w uprawie Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Wrocławskiego w kontekście prowadzonych działań ochronnych

ELŻBIETA CIEŚLAK, MAGDALENA SZCZEPANIAK,
RYSZARD KAMIŃSKI i WALDEMAR HEISE

CIEŚLAK, E., SZCZEPANIAK, M., KAMIŃSKI, R. AND HEISE, W. 2014. The condition of *Gladiolus paluster* (Iridaceae), critically endangered species in Poland – analysis of genetic variation of individuals in *ex situ* culture in the Botanical Garden of Wrocław University in the context of ongoing conservation efforts. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica* 21(1): 49–66. Kraków. PL ISSN 1640-629X.

ABSTRACT: *Gladiolus paluster* Gaudin is a species protected by the domestic and EU laws. At present, in Poland several individuals of the species occur only in natural reserve “Łąka Sulistrowicka” (Lower Silesia, south-western Poland). Seeds derived from this relic population were used in the restoration program of *G. paluster* in Poland. Genetic diversity of individuals of *G. paluster* origin from reserve “Łąka Sulistrowicka” and currently grown in *ex situ* culture in Botanical Garden of Wrocław University were studied using AFLPs. The obtained results show that both *G. paluster* and hybrids of *G. paluster* and *G. imbricatus* occur in *ex situ* culture. We suggest that hybridization took place already at the natural locality in the “Łąka Sulistrowicka”. Individuals of *G. paluster* are characterized by a significantly lower genetic diversity than *G. imbricatus* individuals from natural populations.

KEY WORDS: *Gladiolus paluster*, *Gladiolus imbricatus*, hybrids, endangered plant species, genetic diversity, AFLP, restoration, conservation, Poland

E. Cieślak, M. Szczepaniak, Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, ul. Lubicz 46, 31-512 Kraków, Polska; e-mail: e.cieslak@botany.pl; m.szczepaniak@botany.pl

R. Kamiński, Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Sienkiewicza 23, 50-325 Wrocław, Polska; e-mail: ryszard.kaminski@uni.wroc.pl

W. Heise, Zakład Ekologii Roślin, Instytut Botaniki UJ, ul. Lubicz 46, 31-512 Kraków, Polska; e-mail: waldemar.heise@uj.edu.pl

WSTĘP

Rodzaj *Gladiolus* L. (mieczyk), należy do rodziny *Iridaceae* Juss. (kosaćcowate) i występuje w Azji, w Europie oraz Afryce (HAMILTON 1980; MEUSEL i in. 1965). Większość z ponad 260 gatunków należących do rodzaju *Gladiolus* pochodzi z Afryki Południowej (GOLDBLATT 1996; GOLDBLATT & MANNING 1999; MANNING i in. 2002), gdzie obszar Kraju

Przylądkowego uważa się za centrum różnorodności tego rodzaju (GOLDBLATT & MANNING 1999; VALENTE i in. 2011).

Około 10 gatunków rodzaju *Gladiolus* jest rodzimych dla Europy (HAMILTON 1980), wśród nich znajduje się *Gladiolus paluster* Gaudin, mieczyk błotny (KULCZYŃSKI 1919; MIREK i in. 2002) (syn. *G. palustris* Gaudin). Jego zasięg, obejmujący obszar submediterrkańsko-pannońsko-środkowoeuropejski (MEUSEL i in. 1965), charakteryzuje się dużym rozproszeniem stanowisk i gatunek jest rzadki lub bardzo rzadki. W Europie centralnej występuje głównie na łąkach trzęślicowych ze związku *Molinion* (MATUSZKIEWICZ 2005; FORT 2006; BILZ i in. 2011). Był również odnotowywany w fitocenozach ze związku *Bromion erecti* i w ciepłolubnych dąbrowach należących do zespołu *Carici fritschii-Quercetum roboris* (ČEŘOVSKÝ & GRULICH 1999; BERDOWSKI 2004). Na obszarach podgórskich Europy południowo-zachodniej jego skala fitosocjologiczna jest szersza (SCHMITT i in. 2010). W Polsce podawany był również z płatów świetlistych lasów z zespołów *Potentillo-Quercetum*, *Peucedano-Pinetum*, *Carpinetum betuli* i w skrajnych przypadkach z muraw kserotermicznych, prawdopodobnie z zespołu *Adonido-Brachypodietum* z klasy *Festuco-Brometea* (PREUSS 1883; ABROMEIT i in. 1940; BERDOWSKI 2004; MATUSZKIEWICZ 2005).

Z uwagi na odnotowywane niekorzystne zmiany w naturalnych siedliskach tego gatunku i zmniejszającą się i tak niewielką liczbę populacji, *Gladiolus paluster* został włączony do grupy gatunków zagrożonych wyginięciem w Europie i uznany za gatunek priorytetowy dla ochrony bioróżnorodności (dodany do Załącznika II DS w ramach Traktatu Akcesyjnego z 2003 r.). W wielu krajach został umieszczony na krajowych „czerwonych listach” i w „czerwonych księgach”, jak np. w Bułgarii (PETROVA & VLADIMIROV 2009), Czechach (PROCHÁZKA 2001), Niemczech (KORNECK i in. 1996), Polsce (ZARZYCKI & WOJEWODA 1986; BARYŁA & CZYŁOK 2001; ZARZYCKI & SZELĄG 2006), Słowacji (MEREĐA & HODÁLOVÁ 2011), Szwajcarii (MOSER i in. 2002), Ukrainie (DIDUCH 2009) czy na Węgrzech (KIRÁLY 2007). Ujęty jest także na europejskiej (BILZ i in. 2011) oraz światowej „czerwonej liście” zagrożonych gatunków roślin (WALTER & GILLET 1998; BILZ 2011). Na podstawie ostatnich raportów monitoringu gatunków chronionych, sporządzonych w 2008 r. przez kraje członkowskie UE (w ramach art. 17 Dyrektywy Siedliskowej) wykazano, że stan zachowania populacji *G. paluster* w Polsce, Czechach, Słowacji, Francji oraz na Węgrzech jest bardzo zły (kategoria U2; ANONYMOUS 2005).

W Polsce *Gladiolus paluster* jest jednym z najrzadszych i najbardziej zagrożonych wyginięciem elementów flory (BARYŁA & CZYŁOK 2001). Występuje obecnie na jednym stanowisku naturalnym, położonym w rezerwacie przyrody „Łąka Sulistrowicka” w masywie Ślęży na Dolnym Śląsku, które jest objęte monitoringiem (KAMIŃSKI 2012). Pozostałe, dziś już historyczne stanowiska, zlokalizowane były głównie w północno-zachodniej i południowo-zachodniej części Polski (ZAJĄC & ZAJĄC 2001; BERDOWSKI 2004). Dokładna analiza źródeł XIX i XX-wiecznych pokazuje, że na terenie samego Pomorza i Wielkopolski gatunek posiadał 12 stanowisk (KÜHLING 1866; PREUSS 1883; ABROMEIT 1892, 1897; PFUHL 1896; MILLER 1902; BOCK 1908; ABROMEIT i in. 1940), czyli więcej, niż wynikałoby to z dotychczasowych danych (ZAJĄC & ZAJĄC 2001; BERDOWSKI 2004). Uważa się, że ostatnie stanowisko na terenie Polski północnej, położone w obrębie rezerwatu Dzikie Ostrów koło Bydgoszczy zanikło w drugiej połowie XX w. (BERDOWSKI 2004).

Przyczyną złego stanu i drastycznego zmniejszenia liczby populacji *Gladiolus paluster* była zmiana form użytkowania i osuszanie łąk i lasów, w których gatunek występował. W celu jego ochrony w Polsce, zainicjowano działania, których efektem ma być jego ponowne wprowadzenie do siedlisk naturalnych. Prace związane z restytucją *G. paluster* zostały rozpoczęte w 2004 r. Materiał wyjściowy stanowiły nasiona pobrane z kilku ocalałych okazów mieczyków z rezerwatu „Łąka Sulistrowicka”. W Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego rośliny rozmnożono i w 2009 r. część z nich reintrodukowano na stanowisko naturalne na „Łące Sulistrowickiej”, a część introdukowano na stanowiska zastępcze, położone głównie na terenie Dolnego Śląska. W 2014 r. planowane jest przeprowadzenie monitoringu stanu tych populacji i ocena skuteczności prowadzonych zabiegów. W ramach tych działań ochronnych, w 2011 r. wysadzono również ok. 5000 sztuk mieczyka błotnego na 10 stanowiskach zastępczych na terenie Krajny i Pałuk w województwie kujawsko-pomorskim (projekt POIS.05.01.00-00-329/10, finansowany ze środków Unii Europejskiej i Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej, realizowany przez Polskie Towarzystwo Ochrony Przyrody „Salamandra” we współpracy z wrocławskim ogrodem).

Biorąc pod uwagę fakt, że materiałem wyjściowym dla tworzonych populacji było tylko kilka osobników *Gladiolus paluster* z populacji naturalnej, inspiracją do podjęcia przez nas badań molekularnych było ustalenie poziomu zmienności i zróżnicowania genetycznego osobników *Gladiolus* utrzymywanych w uprawie. Jest to ważny aspekt restytucji, ponieważ dla nowo tworzonych, potencjalnych populacji tego gatunku, osobniki z uprawy stanowią pulę „początkowej” zmienności genetycznej. Takie badania są uważane za kluczowe w przypadku planowania prac związanych z restytucją gatunków rzadkich i zagrożonych (KRAUSS i in. 2002; VANDER MIJNSBRUGGEA i in. 2010; WEEKS i in. 2011). Dodatkowo, wyniki wcześniejszych badań morfologicznych osobników z „Łąki Sulistrowickiej”, wykazały obecność *G. paluster*, *G. imbricatus*, jak również osobników o cechach pośrednich pomiędzy *G. paluster* i *G. imbricatus* (KAMIŃSKI 2012). Jednocześnie, kondycja populacji w czasie pobierania materiału do uprawy *ex situ* (7 okazów) nie dawała możliwości selektywnego wyboru osobników *G. paluster*, a zatem istotne było również ustalenie statusu taksonomicznego osobników pozostających w uprawie.

W związku z powyższym, celami badań przedstawionymi w niniejszej pracy były: (1) analiza zmienności genetycznej *Gladiolus paluster* w obrębie osobników znajdujących się w uprawie *ex situ*, zlokalizowanej na terenie Ogródu Botanicznego Uniwersytetu Wrocławskiego, (2) ustalenie relacji genetycznych pomiędzy uprawianymi osobnikami *G. paluster* pochodzącymi z europejskich populacji, (3) analiza zmienności wewnątrz- i międzypopulacyjnej *G. imbricatus* w oparciu o materiał pochodzący z wybranych, naturalnych stanowisk z terenu Polski oraz (4) ustalenie relacji genetycznych pomiędzy osobnikami *Gladiolus* z uprawy *ex situ* i *G. imbricatus* z naturalnych populacji.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto materiał roślinny z 49 osobników pochodzących z uprawy, znajdującej się w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego, który obejmował osobniki morfologicznie oznaczone jako: *Gladiolus paluster*, *G. imbricatus*, przypuszczalnie mieszańce tych gatunków oraz 29 osobników

Tabela 1. *Gladiolus paluster*, *G. imbricatus* oraz mieszańce pomiędzy *G. paluster* i *G. imbricatus* objęte badaniami genetycznymi metodą AFLP. UWr – Uniwersytet Wrocławski

Table 1. *Gladiolus paluster*, *G. imbricatus* and hybrids of *G. paluster* and *G. imbricatus* studied using AFLPs. UWr – Wrocław University

Takson Taxon	Skrót Acronym	Nazwy osobników Names of individuals	Liczba osobników Number of individuals	Stanowisko Locality
<i>Gladiolus paluster</i>	Gpa	WR0202–WR0211 WR0213–WR0217 WR0219–WR0224	22	uprawa w Ogrodzie Botanicznym UWr, rośliny z rezerwatu „Łąka Sulistrowicka” <i>ex situ</i> culture in Botanical Garden of UWr, plants from the “Łąka Sulistrowicka” reserve
		WR0401–WR0402	2	uprawa w Ogrodzie Botanicznym UWr, rośliny z populacji niemieckiej – Baden-Württemberg, Landkreis Konstanz, rezerwat Wollmatinger Ried <i>ex situ</i> culture in Botanical Garden of UWr, plants from the German population – Baden-Württemberg, Landkreis Konstanz, Wollmatinger Ried reserve
mieszańce hybrids	Gpa-Gim	WR0101–WR0116 WR0501–WR0507, WR0601	24	uprawa w Ogrodzie Botanicznym UWr, rośliny pochodzące z rezerwatu „Łąka Sulistrowicka” <i>ex situ</i> culture in Botanical Garden of UWr, plants from the “Łąka Sulistrowicka” reserve
<i>Gladiolus imbricatus</i>	Gim	WR0301	1	uprawa w Ogrodzie Botanicznym UWr, roślina z populacji czeskiej – Morawy, nad rzeką Dyja <i>ex situ</i> culture in Botanical Garden of UWr, plant from the Czech population – Moravia, on the Dyja river
	Gim-K		11	populacja naturalna, Polska – Kostrze – Koło Tynieckie, N50°01' E19°49' natural population, Poland – Kostrze – Koło Tynieckie, N50°01' E19°49'
	Gim-Pp		9	populacja naturalna, Polska – Pod Polankami, N49°40' E19°25' natural population, Poland – Pod Polankami, N49°40' E19°25'
	Gim-Prz		9	populacja naturalna, Polska – Przy Pustelnikach, N49°49' E19°26' natural population, Poland – Przy Pustelnikach, N49°49' E19°26'

G. imbricatus, zebranych z trzech naturalnych populacji z terenu Polski (Tab. 1). W grupie z uprawy uwzględniono również osobniki pochodzące z populacji spoza granic Polski: z Niemiec (WR0401, WR0402), oznaczone jako *G. paluster* oraz osobnik z Czech (WR0301), oznaczony jako *G. imbricatus*. W sumie przeanalizowano 78 osobników.

Analizy molekularne przeprowadzone metodą AFLP

Pojedynczą próbę w analizach molekularnych stanowił fragment liścia. Całkowite DNA z wszystkich prób wyizolowano zestawem DNAazy Mini kit 96 (typ kolumnkowy; Qiagen) według procedury podanej przez producenta. Jakość oraz ilość DNA w poszczególnych próbach sprawdzono na żelu agarozowym.

Analizy molekularne przeprowadzono metodą AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) według protokołu podanego przez Vos'a i in. (1995), z modyfikacjami (RONIKIER i in. 2008). Analizę przeprowadzono w dwóch etapach. Etap wstępny obejmował pilotaż poszczególnych etapów tej metody, tj. reakcje restrykcji, ligacji, pre-PCR i selektywnego PCR (w tym kontrolę na żelu agarozowym

i elektroforezę fragmentów DNA na sekwencjonerze), test powtarzalności metody oraz test i wybór par primerów, które następnie uwzględniono w analizie całego badanego materiału. W części zasadniczej metody wykonano analizę 78 osobników z użyciem trzech par primerów: *EcoACA-MseCAC*, *EcoAGG-MseCTG* oraz *EcoACT-MseCAG*. Poszczególne etapy analizy były przeprowadzone na termocyklerze firmy Applied Biosystems, a rozdział produktu reakcji selektywnego PCR-u przeprowadzono z wykorzystaniem standardu masowego ROX-500 (Applied Biosystems) na sekwencjonerze ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Dla każdego gatunku w analizach uwzględniono replikaty genotypowania (ok. 10–15% badanych prób), pozwalające na kontrolę powtarzalności uzyskanych profilów i eliminację niepowtarzalnych fragmentów DNA. Próby replikowane pochodziły z jednego izolatu DNA.

Analiza danych uzyskanych metodą AFLP

Ostatecznym efektem analizy AFLP były otrzymane profile fragmentów DNA w zakresie wielkości 50–500 bp, które przeanalizowano programem GENEMAPPER 3.7 (Applied Biosystem), manualnie sprawdzono, a następnie dodatkowo przeanalizowano za pomocą programu SCANAFLP (HERRMANN i in. 2010), w celu otrzymania powtarzalnych markerów genetycznych. Dane zapisano w postaci zero-jedynkowej maczy danych (brak fragmentu / fragment obecny), stanowiącej podstawę analiz statystycznych.

Poziom polimorfizmu w populacjach / taksonach został określony na podstawie udziału fragmentów polimorficznych (P , $P\%$), fragmentów charakterystycznych (P_{ch} – fragment obecny u co najmniej 1 osobnika z danej populacji / taksonu, nieobecny w innych populacjach / taksonach), fragmentów prywatnych (P_p – fragment obecny u wszystkich osobników z populacji / taksonu, nieobecny w innych populacjach / taksonach), jak również wartości współczynnika zmienności genetycznej Nei'a (H_j) (NEI 1987), obliczonych przy użyciu programów AFLPdat (EHRICH 2006) oraz FAMD 1.25 (SCHLÜTER & HARRIS 2006).

Wzajemne zależności pomiędzy badanymi osobnikami, populacjami i taksonami przeanalizowano za pomocą dendrogramu odległości genetycznych NEI & LI (1979) z zastosowaniem metody UPGMA, otrzymanego przy wykorzystaniu programu TREECON 1.3b (VAN DE PEER & DE WACHTER 1994) oraz w oparciu o analizę głównych współrzędnych (PCoA – Principal Coordinate Analysis), w której uwzględniono macycę odległości genetycznych NEI & LI (1979), wykonanej z użyciem programu FAMD 1.25 (SCHLÜTER & HARRIS 2006).

Struktura genetyczna badanych taksonów *Gladiolus* była analizowana za pomocą programu STRUCTURE 2.2.4 (FALUSH i in. 2007), wykorzystującego analizę Bayesowskiego grupowania osobników z użyciem algorytmu metody Monte Carlo i łańcuchów Markowa (Markov Chain Monte Carlo; MCMC). Zastosowano model mieszany i niezależną frekwencję alleli. Markery AFLP są markerami dominującymi, dlatego przyjęto model uwzględniający obecność alleli recesywnych. Przetestowano liczbę grup (K) od 1 do 6. Dla każdego K wykonano 5 powtórzeń, w celu sprawdzenia powtarzalności wyników grupowania poszczególnych osobników. Za pomocą programu STRUCTURE-SUM-2009 2.3.3 (EHRICH i in. 2007) podsumowano otrzymane wyniki ze STRUCTURE. Na podstawie wartości współczynnika podobieństwa pomiędzy powtórzeniami dla każdego K , wartości ΔK oraz prawdopodobieństwa K (EVANNO i in. 2005) określono optymalną liczbę grup (K) dla poszczególnych analiz.

Poziom zmienności genetycznej wewnątrz- i międzypopulacyjnej *Gladiolus imbricatus* oszacowano za pomocą analizy wariancji molekularnej (AMOVA). Z użyciem AMOVA przetestowano również wyniki grupowania osobników otrzymane w wyniku analizy Bayesowskiej. Analizy wykonano przy wykorzystaniu programu ARLEQUIN 3.5.1.2 (EXCOFFIER & LISCHER 2010), a istotność wyników oszacowano na podstawie 1000 powtórzeń.

WYNIKI BADAŃ

W analizie AFLP, uwzględniając 78 osobników, przy użyciu trzech par selektywnych primerów: *EcoACA-MseCAC*, *EcoAGG-MseCTG*, *EcoACT-MseCAG* otrzymano łącznie 239 powtarzalnych i informatywnych fragmentów AFLP, z czego 190 (79,5%) było

polimorficznych dla badanych taksonów. Średnio, dla pojedynczego badanego osobnika, uzyskano 136 fragmentów AFLP. Powtarzalność profilów AFLP była wysoka i wynosiła 95%.

Zmienność i zróżnicowanie genetyczne osobników *Gladiolus* z uprawy

Osobniki *Gladiolus paluster*, pochodzące z uprawy w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego, charakteryzowały się najniższym poziomem polimorfizmu spośród wszystkich badanych osobników. Dla 24 osobników *G. paluster* stwierdzono 25 (10%) polimorficznych fragmentów AFLP, 9 (4%) fragmentów charakterystycznych (P_{ch}) i nie odnotowano fragmentów prywatnych (P_p). Wartość współczynnika zmienności genetycznej Nei'a (H_j) wynosiła 0,022 (Tab. 2). Przepuszczalne mieszańce pomiędzy *G. paluster* i *G. imbricatus* charakteryzowały się wyższym poziomem zmienności niż *G. paluster* i dla nich odnotowano 67 (28%) polimorficznych fragmentów AFLP, współczynnik zmienności genetycznej Nei'a (H_j) osiągnął wartość $H_j = 0,089$ i nie stwierdzono fragmentów prywatnych AFLP (P_p). Natomiast liczba fragmentów charakterystycznych (P_{ch}) u mieszańców wynosiła 3 (1%) i była niższa niż u *G. paluster* (Tab. 2).

Porównanie wartości odległości genetycznych F_{ST} pomiędzy grupami osobników znajdującymi się w uprawie oraz populacjami naturalnymi *Gladiolus imbricatus* wykazało, że osobniki *G. paluster* charakteryzowały się największą odrębnością genetyczną od pozostałych uwzględnionych w badaniach (zakres F_{ST} wahał się od 0,81 do 0,92; Tab. 3). Stwierdzono, że osobniki z uprawy, oznaczone na podstawie morfologii jako *G. imbricatus*, które zostały przeniesione z rezerwatu „Łąka Sulistrowicka”, genetycznie nie odróżniały się od osobników o cechach pośrednich z uprawy ($F_{ST} = 0,09$, $P = 0,1$).

Tabela 2. Parametry zmienności genetycznej AFLP *Gladiolus paluster*, *G. imbricatus* oraz mieszańców *G. paluster* i *G. imbricatus*. N – liczba badanych osobników metodą AFLP, P – liczba prążków polimorficznych, P% – procent prążków polimorficznych, P_{ch}/P_p – fragmenty charakterystyczne / fragmenty prywatne, H_j – współczynnik zmienności genetycznej Nei'a. Skróty nazw według tabeli 1

Table 2. AFLP parameters of genetic diversity of *Gladiolus paluster*, *G. imbricatus* and hybrids of *G. paluster* and *G. imbricatus*. N – number of the individuals studied using AFLPs, P – number of polymorphic bands, P% – percentage of polymorphic bands, P_{ch}/P_p – diagnostic / private AFLP fragments, H_j – coefficient of Nei's genetic diversity. Abbreviations as in Table 1

Takson Taxon	N	P	P%	P_{ch}	P_p	H_j
Gpa	24	25	10	9	0	0,022
Gim	30	92	38	30	1	0,110
Gpa-Gim	24	67	28	3	0	0,089
Populacja Population						
Gim-K	11	60	25	4	0	0,084
Gim-Pp	9	61	26	5	0	0,095
Gim-Prz	9	59	25	2	0	0,100
Razem Total	78					

Zmienność i zróżnicowanie *Gladiolus imbricatus* z naturalnych populacji

Gladiolus imbricatus z naturalnych populacji posiadał 92 (38%) polimorficzne fragmenty AFLP, 30 (13%) fragmentów charakterystycznych (P_{ch}) i 1 (0,4%) fragment prywatny AFLP (P_p). Współczynnik zmienności genetycznej *G. imbricatus* wynosił $H_j = 0,110$ (Tab. 2). Ogólnie, gatunek ten charakteryzował się znacząco wyższym poziomem zmienności genetycznej niż *G. paluster* z uprawy.

Badane populacje naturalne *Gladiolus imbricatus* cechowały się porównywalnym poziomem zmienności genetycznej. Liczba polimorficznych fragmentów AFLP w trzech populacjach *G. imbricatus* była wyrównana i wynosiła odpowiednio: w populacji Gim-K – 60 (25%), w Gim-Pp – 61 (26%) i w Gim-Prz – 59 (25%). Dla każdej populacji odnotowano obecność fragmentów charakterystycznych (P_{ch}), odpowiednio: 5 w populacji Gim-Pp, 4 w populacji Gim-K oraz 2 w populacji Gim-K (Tab. 2). Natomiast w żadnej populacji *G. imbricatus* nie stwierdzono prywatnych fragmentów AFLP (P_p). Wartości współczynnika zmienności genetycznej Nei'a (H_j) w poszczególnych populacjach *G. imbricatus* były wyrównane wynosząc odpowiednio: Gim-K – 0,084, w Gim-Pp – 0,095 oraz w Gim-Prz – 0,100 (Tab. 2).

Ustalenie struktury genetycznej *Gladiolus imbricatus* na podstawie wyników analizy wariancji molekularnej (AMOVA) wykazało, że gatunek charakteryzował się znacząco wyższą wartością składowej wewnątrzpopulacyjnej w stosunku do składowej międzypopulacyjnej całkowitego zróżnicowania genetycznego (Tab. 4). Porównanie odległości genetycznych F_{ST} wykazało, że populacja *G. imbricatus* z Kostrza różniła się genetycznie zarówno od populacji ze stanowiska Pod Polankami ($F_{ST} = 0,27$; $P < 0,001$), jak i od populacji ze stanowiska Przy Pustelnikach ($F_{ST} = 0,29$; $P < 0,001$). Natomiast populacje ze stanowisk Pod Polankami i Przy Pustelnikach były genetycznie podobne ($F_{ST} = 0,06$; $P = 0,1$; Tab. 3).

Tabela 3. Odległości genetyczne (F_{ST}) pomiędzy badanymi grupami osobników i populacji *Gladiolus*, oszacowane na podstawie wyników analizy AFLP, * – $P < 0,001$. Skróty według tabeli 1

Table 3. Pairwise genetic distances (F_{ST}) for individuals groups and populations of *Gladiolus* based on the AFLP analyses, * – $P < 0,001$. Abbreviations as in Table 1

	Gpa	Gpa-Gim	Gim-K	Gim-Pp	Gim-Prz
Gpa	–				
Gpa-Gim	0,81*	–			
Gim-K	0,92*	0,78*	–		
Gim-Pp	0,92*	0,77*	0,27*	–	
Gim-Prz	0,92*	0,77*	0,29*	0,06	–

Wartości odległości genetycznych F_{ST} pomiędzy trzema naturalnymi populacjami *Gladiolus imbricatus* w odniesieniu do taksonów znajdujących się w uprawie, tj. *G. paluster* oraz prawdopodobnych mieszańców były wysokie i oscylowały w przedziale od $F_{ST} = 0,77$ do $F_{ST} = 0,92$ ($P < 0,001$; Tab. 3).

Przeprowadzona analiza skupień oraz analiza głównych koordynatów (PCoA) z uwzględnieniem macierzy odległości genetycznych Nei & Li (1979) pomiędzy wszystkimi badanymi

Tabela 4. Wyniki analizy wariancji molekularnej (AMOVA) *Gladiolus paluster*, *G. imbricatus* oraz mieszańców *G. paluster* i *G. imbricatus* na podstawie 239 fragmentów AFLP, * – $P < 0,001$

Table 4. Results of the analysis of molecular variance (AMOVA) based on the 239 AFLP fragments obtained for *Gladiolus paluster*, *G. imbricatus* and hybrids of *G. paluster* and *G. imbricatus*, * – $P < 0,001$

Źródło zmienności Source of variation	d.f.	Suma kwadratów Sum of squares	Poziom wariancji Level of variance	Procent wariancji Percentage of variance
<i>Gladiolus imbricatus</i>				
Między populacjami Among populations	2	81,99	3,11	22,03
Wewnątrz populacji Within populations	26	286,63	11,02	77,97
Suma Total	28	368,62	14,14	$F_{ST} = 0,22^*$
<i>Gladiolus paluster</i> versus <i>G. imbricatus</i> versus mieszańce <i>G. paluster</i> i <i>G. imbricatus</i> <i>Gladiolus paluster</i> versus hybrids of <i>G. paluster</i> and <i>G. imbricatus</i>				
Między taksonami Among taxa	2	1859,85	33,89	74,61
Między populacjami w taksonach Among populations within taxa	3	109,54	2,70	5,94
Wewnątrz populacji Within populations	72	636,03	8,83	19,45
Suma Total	77	2605,42	45,42	$F_{ST} = 0,81^*$

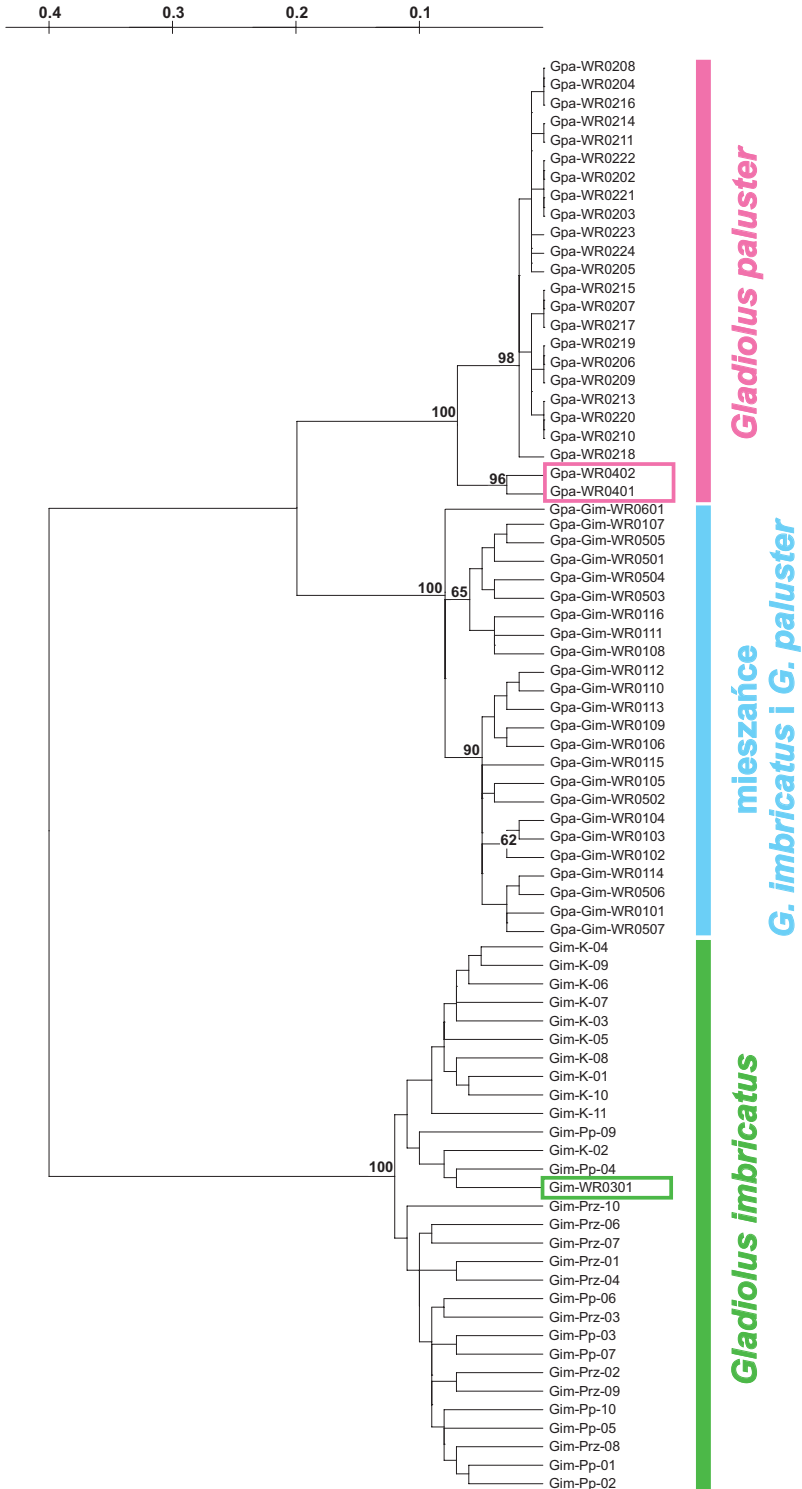
osobnikami *Gladiolus*, wykazały istnienie trzech grup, odpowiadających *G. paluster* z uprawy, formom pośrednim pomiędzy *G. paluster* i *G. imbricatus* również z uprawy w Ogrodzie Botanicznym i *G. imbricatus* z naturalnych populacji (Ryc. 1, 2). Okazało się, że osobniki z uprawy, oznaczone na podstawie morfologii jako *G. imbricatus*, utworzyły wspólną grupę z osobnikami o cechach przejściowych *G. paluster* i *G. imbricatus*. Na podstawie wyników AFLP, potwierdzono występowanie w uprawie *G. paluster* oraz mieszańców pomiędzy *G. paluster* i *G. imbricatus*, które zostały przeniesione do uprawy z rezerwatu „Łąka Sulistrowicka”. Potwierdzono również, że okazy w uprawie pochodzące z Niemiec (Gpa-WR0401 i Gpa-WR0402) należą do *G. paluster*. Natomiast okaz znajdujący się w uprawie, otrzymany z Czech (Gim-WR0301) to *G. imbricatus* (Ryc. 1, 2).

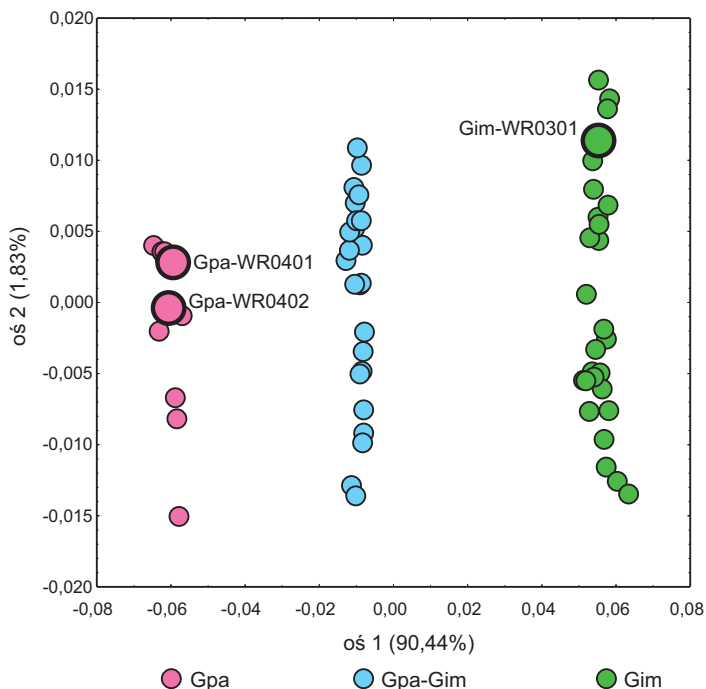
Na podstawie analizy Bayesowskiej, przeprowadzonej dla wszystkich badanych osobników *Gladiolus* z populacji naturalnych i uprawy stwierdzono, że optymalny podział na



Ryc. 1. Analiza skupień 78 osobników *Gladiolus paluster* (Gpa), mieszańców *G. paluster* i *G. imbricatus* (Gpa-Gim), pochodzących z uprawy w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego oraz *G. imbricatus* (Gim) z populacji naturalnych (Gim-K, Gim-Pp, Gim-Prz), oparta na analizie AFLP i odległościach genetycznych (współczynnik Nei & Li) z zastosowaniem metody UPGMA. Na dendrogramie zaznaczono osobniki *G. paluster* z Niemiec (Gpa-WR0401, Gpa-WR0402) oraz *G. imbricatus* z Czech (Gim-WR0301). Skróty nazw według tabeli 1

Fig. 1. UPGMA dendrogram of 78 individuals of *Gladiolus paluster* (Gpa), hybrids of *G. paluster* and *G. imbricatus* (Gpa-Gim) from *ex situ* culture in Botanical Garden of Wrocław University as well as *G. imbricatus* (Gim) from natural populations (Gim-K, Gim-Pp, Gim-Prz), based on the AFLPs analyses and genetic distance matrix (Nei & Li coefficient). Individuals of *G. paluster* from Germany (Gpa-WR0401, Gpa-WR0402) and *G. imbricatus* from Czech Republic (Gim-WR0301) were marked on the dendrogram. Abbreviations as in Table 1



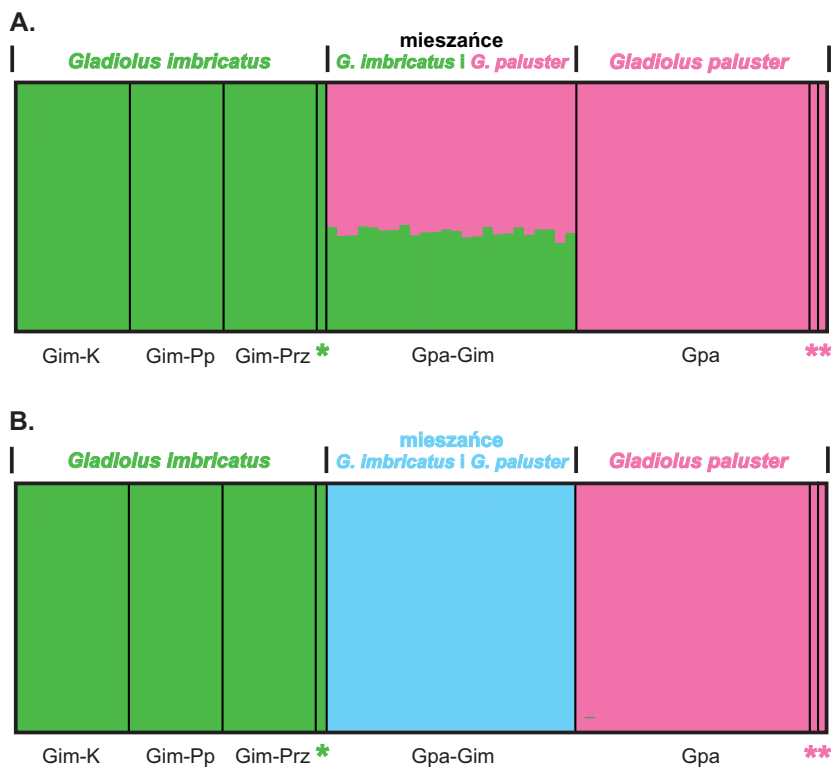


Ryc. 2. Analiza głównych współrzędnych (PCoA) oparta na matrycy odległości genetycznych (współczynnik Nei & Li) – diagram rozrzutu 78 osobników *Gladiolus paluster* (Gpa), mieszańców *G. paluster* i *G. imbricatus* (Gpa-Gim), pochodzących z uprawy w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego oraz *G. imbricatus* (Gim) z populacji naturalnych względem 1 i 2 osi. Na diagramie zaznaczono osobniki *G. paluster* z Niemiec (Gpa-WR0401, Gpa-WR0402) oraz *G. imbricatus* z Czech (Gim-WR0301). Skróty nazw według tabeli 1

Fig. 2. Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on the genetic distance matrix (Nei & Li coefficient) – scatter diagram of 78 individuals of *Gladiolus paluster* (Gpa), hybrids of *G. paluster* and *G. imbricatus* (Gpa-Gim) from *ex situ* culture in Botanical Garden of Wrocław University as well as *G. imbricatus* (Gim) from natural populations with respect to the 1 and 2 axis. Individuals of *G. paluster* from Germany (Gpa-WR0401, Gpa-WR0402) and *G. imbricatus* from Czech Republic (Gim-WR0301) were marked on the diagram. Abbreviations as in Table 1

grupy określony na podstawie wartości ΔK oraz prawdopodobieństwa K zachodzi przy $K = 2$. Wyróżnione grupy odpowiadają osobnikom *G. paluster* i *G. imbricatus* (Ryc. 3A). U wszystkich osobników z uprawy o pośrednich cechach morfologicznych, stwierdzono porównywalny udział pul genetycznych charakterystycznych dla *G. paluster* i *G. imbricatus*. Analiza jednoznacznie potwierdziła oznaczenie osobnika Gim-WR0301 z Czech jako *G. imbricatus*.

Kolejny poziom analizy Bayesowskiej przy $K = 3$ wykazał, że osobniki mieszańcowe z uprawy cechują się odrębną pulą genetyczną w odniesieniu do *Gladiolus paluster* i *G. imbricatus* (Ryc. 3B). Wyniki analizy wariacji molekularnej (AMOVA) z uwzględnieniem podziału na trzy wyróżnione grupy, przyjętym na podstawie wyników analizy STRUCTURE, potwierdziły występowanie *G. paluster*, *G. imbricatus* oraz mieszańców pomiędzy *G. paluster* i *G. imbricatus* w badanym materiale ($P < 0,01$; Tab. 4).



Ryc. 3. Analiza Bayesowska osobników *Gladiolus paluster* (Gpa), mieszańców *G. paluster* i *G. imbricatus* (Gpa-Gim), pochodzących z uprawy w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego oraz *G. imbricatus* z populacji naturalnych (Gim-K, Gim-Pp, Gim-Prz), oparta na wynikach AFLP. Zaznaczono osobniki z uprawy, pochodzące z Niemiec – ***G. paluster* (Gpa-WR0401, Gpa-WR0402) oraz z Czech – **G. imbricatus* (Gim-WR0301). Kolory odpowiadają poszczególnym pulom genetycznym: **A.** $K = 2$ i **B.** $K = 3$. Skróty nazw według tabeli 1

Fig. 3. Results of Bayesian analysis **A.** $K = 2$ and **B.** $K = 3$ for individuals of *Gladiolus paluster* (Gpa), hybrids of *G. paluster* and *G. imbricatus* (Gpa-Gim) from *ex situ* culture in Botanical Garden of Wrocław University and *G. imbricatus* from natural populations (Gim-K, Gim-Pp, Gim-Prz) based on AFLPs results. Individuals of ***G. paluster* from Germany (Gpa-WR0401, Gpa-WR0402) and **G. imbricatus* from Czech Republic (Gim-WR0301) were marked. Abbreviations as in Table 1

DYSKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych badań AFLP stwierdzono, że w uprawie mieczyków, pochodzących z „Łąki Sulistrowickiej”, w Ogrodzie Botanicznym Uniwersytetu Wrocławskiego znajdują się *Gladiolus paluster* oraz mieszańce pomiędzy *G. paluster* i *G. imbricatus*. Wykazano, że wszystkie osobniki z uprawy, na podstawie cech morfologicznych oznaczone jako *G. imbricatus*, są mieszańcami *G. paluster* i *G. imbricatus*. Potwierdzono także, że w uprawie znajduje się *G. paluster*, pochodzący z Niemiec (Gpa-WR0401 i Gpa-WR0402) oraz *G. imbricatus*, pochodzący z Czech (Gim-WR0301; Ryc. 1, 2, 3).

Osobniki *Gladiolus paluster* z polskiej populacji charakteryzowały się istotną odrębnością genetyczną od osobników z populacji niemieckiej (Ryc. 1). W wyniku badań wykazano,

że *G. paluster* z uprawy charakteryzował się prawie czterokrotnie niższą zmiennością genetyczną niż *G. imbricatus*, pochodzący z populacji naturalnych (Tab. 2). Uwzględniając informację, że oba gatunki są obcocyplne wydaje się, że wartości parametrów charakteryzujących poziom zmienności genetycznej obu gatunków powinny być zbliżone. Należy jednak podkreślić, że w przypadku *G. paluster* materiał z uprawy pochodził jedynie od kilku ocalałych osobników w rezerwacie „Łąka Sulistrowicka”. Stwierdzony niski polimorfizm genetyczny *G. paluster* może nie odzwierciedlać rzeczywistego poziomu zmienności genetycznej naturalnych populacji. W celu jednoznacznego potwierdzenia tego faktu należałoby porównać polimorfizm populacji z uprawy z naturalnymi populacjami *G. paluster* z europejskiego zasięgu.

Analiza AFLP potwierdziła obecność w uprawie osobników o cechach pośrednich pomiędzy *G. paluster* i *G. imbricatus*. Na podstawie obserwacji występowania gatunków roślin w rezerwacie „Łąka Sulistrowicka” wiadomo, że w mikropopulacji *G. paluster*, z której bezpośrednio pobrano nasiona do uprawy, nie współwystępował *G. imbricatus*. Jednocześnie w najbliższym otoczeniu w obrębie rezerwatu oraz na sąsiadującej łące już poza rezerwatem, występowały duże populacje *G. imbricatus* (KAMIŃSKI 2012). To wskazuje, że mogła zajść hybrydyzacja pomiędzy *G. paluster* i *G. imbricatus* w populacji naturalnej. Przeprowadzona odrębna analiza zróżnicowania sekwencji chloroplastowego i jądrowego DNA również nie potwierdziła obecności *G. imbricatus* w uprawie. Wykazano rozbieżności w przyporządkowaniu osobników morfologicznie określonych jako *G. imbricatus*, pochodzących z uprawy (CIEŚLAK & SZCZEPANIAK, dane niepublikowane). W przypadku analizy DNA chloroplastowego zostały one umieszczone w grupie z *G. paluster*, a w analizie regionu ITS jądrowego DNA zostały włączone do grupy z *G. imbricatus*. Ich obecność w grupie z *G. paluster* w przypadku fragmentów chloroplastowych świadczy o tym, że dla tych osobników gatunkiem matczynym był *G. paluster*. Z drugiej strony, przyporządkowanie tych osobników do grupy *G. imbricatus* w analizie regionu jądrowego DNA wskazuje, że jest to gatunek ojcowski dla tych osobników. Natomiast brak sekwencji specyficznych ITS dla okazów mieszańcowych może oznaczać, że w obrębie jądrowego DNA proces homogenizacji postępował w kierunku zachowania genotypu ojcowskiego gatunku, tj. *G. imbricatus*. Taki rozkład zmienności genetycznej sugeruje, że sam proces hybrydyzacji zaszedł stosunkowo dawno na stanowisku naturalnym na obszarze „Łąki Sulistrowickiej”, skąd rośliny zostały przeniesione do uprawy (CIEŚLAK & SZCZEPANIAK, dane niepublikowane). Jednakże aktualna kondycja i liczebność populacji w rezerwacie nie pozwala na potwierdzenie powyższego przypuszczenia.

W rezultacie rozpoczętych działań mających na celu restytucję *Gladiolus paluster* w Polsce wszystko wskazuje na to, że udało się zachować rodzimy materiał roślinny z rezerwatu „Łąka Sulistrowicka”; do dyspozycji pozostają namnożone rośliny o znanym poziomie zmienności genetycznej, które mogą być potencjalnie wykorzystane obecnie i w przyszłości. W ramach prowadzonej restytucji pozwoli to z jednej strony na ochronę rodzimych genotypów, a z drugiej – na zachowanie części różnorodności genetycznej całego gatunku. Natomiast konieczny jest monitoring i stała ocena kondycji genetycznej odtwarzanych populacji, ponieważ często w przypadku reintrodukcji gatunków wskutek obniżenia

efektywnej wielkości populacji obserwowane są efekty działania procesów genetycznych, takich jak dryf genetyczny, efekt szyjki butelki czy wysoki poziom inbrodu w populacjach. Wszystko to prowadzi do znacznego spadku zmienności genetycznej, a w konsekwencji do obniżenia potencjału adaptacyjnego gatunku, co może być istotnym powodem wyginięcia reintrodukowanych osobników na danym stanowisku (VANDER MIJNSBRUGGEA i in. 2010; VOLIS i in. 2011; WEEKS i in. 2011). W przypadku restytucji gatunków zagrożonych, gdzie ograniczony materiał roślinny często stanowi wyjściową pulę genetyczną, w uprawie należy zwrócić szczególną uwagę na wysiewanie nasion uzyskanych w wyniku zapylenia krzyżowego, co w pewnym stopniu może przyczynić się do zwiększenia różnorodności genotypowej populacji zachowawczej.

W związku z zagrożeniami dla trwałości gatunków czy populacji, wynikającymi ze współczesnych zmian środowiska, wzrasta zapotrzebowanie na tworzenie populacji zastępczych, czyli translokacji, jako jednego ze sposobów prowadzenia działań czynnej ochrony (WEEKS i in. 2011). W celu zapewnienia długoterminowej trwałości populacji gatunków, programy ochronne powinny uwzględniać zagadnienia dotyczące genetyki populacji i koncentrować się na wzroście genetycznego potencjału adaptacyjnego oraz przywróceniu różnorodności genetycznej populacji i gatunków introdukowanych (KRAUSS i in. 2002).

Ważny jest również monitoring populacji re- i introdukowanych w długiej perspektywie czasowej i publikowanie pełnych wyników obserwacji, zarówno potwierdzających sukces jak i niepowodzenie introdukcji (DRAYTON & PRIMACK 2012). Obserwowane rezultaty restytucji gatunków rzadkich i zagrożonych wskazują, że obecnie najpilniejszymi są badania z zakresu ich ekologii i biologii. Ta wiedza pozwoli na skuteczniejszą uprawę zachowawczą i rozmnażanie roślin, lepszą ocenę nowych siedlisk i ich przygotowanie przed posadzeniem roślin, co zwiększy szanse przetrwania osobników. Istotne jest też, aby uprawy zachowawcze zawierały materiał, który przy tworzeniu nowych populacji będzie odzwierciedlał rzeczywisty poziom zmienności i / lub zróżnicowania genetycznego danej populacji (DRAYTON & PRIMACK 2012). O pełnym sukcesie re- lub introdukcji możemy mówić w przypadku takiej populacji, w której rosną kolejne pokolenia osobników, czyli zachowana jest struktura demograficzna, co umożliwi ciągłość trwania gatunku w przestrzeni i czasie (FAHSELT 2007; GODEFROID i in. 2011). Wydaje się, że udało się osiągnąć taki sukces na stanowiskach zastępczych *Aldrovanda vesiculosa* (KAMIŃSKI 2004) oraz na utworzonym stanowisku zastępczym dla *Cochlearia polonica*, znajdującym się w źródliku rzeki Centurii (Wyżyna Krakowsko-Śląska) (KAŹMIERCZAKOWA 2004; CIEŚLAK i in. 2007, 2010). Natomiast w przypadku *Carlina onopordifolia*, wieloletnie obserwacje wskazują na połowiczny sukces introdukcji, gdyż nie udało się do tej pory w populacjach introdukowanych odtworzyć pełnej struktury demograficznej, charakterystycznej dla populacji naturalnych gatunku (KAŹMIERCZAKOWA 2003). Rozpatrywanie jedynie kilkuletniego przeżycia osobników introdukowanych w kategoriach sukcesu jest zwykle przedwczesne, ponieważ ich śmierć może nastąpić w latach kolejnych, co jest zresztą potwierdzone w wyniku obserwacji wielu gatunków, takich jak np. *Aralia racemosa*, *Lobelia cardinalis*, *Aquilegia canadensis* czy *Saxifraga marylandica* (GODEFROID i in. 2011; DRAYTON & PRIMACK 2012).

Podziękowania. Autorzy składają podziękowania dr. Wojciechowi Paulowi za korektę fragmentów pracy w języku angielskim. Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy, zostały wykonane w ramach programu finansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko 2007–2013 (projekt nr POIS.05.01.00-00-329/10) oraz ze środków Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej. Analizy molekularne przeprowadzono w Pracowni Analiz Molekularnych, Instytutu Botaniki im. W. Szafera PAN w Krakowie.

LITERATURA

- ABROMEIT J. 1892. Bericht über die 31. Jahresversammlung des Preussischen Botanischen Vereins zu Marienburg am 4. Oktober 1892. s. 44.
- ABROMEIT J. 1897. Bericht über die monatlichen Sitzungen im Restaurant “Zum Hochmeister” (am Schloss) im Winterhalbjahre 1896/97, sowie über die gemeinsamen Excursionen im Sommer 1897. Jahresbericht des Preussischen Botanischen Vereins (e.V.) 1896/1897. s. 70.
- ABROMEIT J., NEUHOFF W. & STEFFEN H. 1940. Flora von Ost- und Westpreussen herausgegeben von Preussischen Botanischen Verein zu Königsberg (Pr). s. 1121. Kommissionsverlag Gräfe und Unzer, Königsberg (Pr.).
- ANONYMOUS. 2005. Note to the Habitats Committee. Assessment, monitoring and reporting of conservation status – Preparing the 2001–2007 report under Article 17 of the Habitats Directive (DocHab-04-03/03 rev.3), European Commission, Directorate General Environment, Brussels, 15 March 2005. DG Env. B2/AR D(2004).
- BARYŁA J. & CZYŁOK A. 2001. *Gladiolus paluster* Gaudin, Mieczyk błotny. – W: R. KAŻMIERCZAKOWA & K. ZARZYCKI (red.), Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe, s. 431–432. Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, Instytut Ochrony Przyrody, Polska Akademia Nauk, Kraków.
- BERDOWSKI W. 2004. *Gladiolus paluster* Gaudin, Mieczyk błotny. – W: B. SUDNIK-WÓJCİKOWSKA & H. WERBLAN-JAKUBIEC (red.), Gatunki roślin. Poradnik ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręcznik metodyczny. Tom 9, s. 136–139. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- BILZ M. 2011. *Gladiolus paluster*. – W: IUCN 2013. IUCN red list of threatened species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 April 2014.
- BILZ M., KELL S. P., MAXTED N. & LANSDOWN R. V. 2011. European red list of vascular plants. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- BOCK W. 1908. Taschenflora von Bromberg (Das Netzegebiet). s. xiv + 214. Mittler'sche Buchhandlung, Bromberg.
- CIEŚLAK E., KORBECKA G. & RONIĘK M. 2007. Genetic structure of the critically endangered endemic *Cochlearia polonica* (Brassicaceae): efficiency of the last-chance transplantation. – Botanical Journal of the Linnean Society 155(4): 527–532.
- CIEŚLAK E., KAŻMIERCZAKOWA R. & RONIĘK M. 2010. *Cochlearia polonica* Fröhl. (Brassicaceae), a narrow endemic species of southern Poland: history of conservation efforts, overview of current population resources and genetic structure of populations. – Acta Societatis Botanicorum Poloniae 79(3): 255–261.
- ČEŘOVSKÝ J. & GRULICH V. 1999. *Gladiolus paluster* Gaudin, Mečík bahenni, Mečík močiarni. – W: J. ČEŘOVSKÝ, V. FERÁKOVÁ, J. HOLUB, Š. MAGLOCKÝ & F. PROCHÁZKA (red.), Červená kniha ohrozených a vzácných druhov rastlín a živočíchov SR a ČR. 5. Vyššie rastliny, s. 172. Příroda a. s., Bratislava.
- DIDUCH J. P. (red.). 2009. Red Data Book of Ukraine: Plant Kingdom. s. 912. Globalkonsalting, Kyiv.

- DRAYTON B. & PRIMACK R. B. 2012. Success rates for reintroductions of eight perennial plant species after 15 years. – *Restoration Ecology* **20**(3): 299–303.
- EHRICH D. 2006 AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. – *Molecular Ecology Notes* **6**: 603–604.
- EHRICH D., GAUDEUL M., ASSEFA A., KOCH M., MUMMENHOFF K., NEMOMISSA S., INTRABIODIV CONSORTIUM & BROCHMANN C. 2007. Genetic consequences of Pleistocene range shifts: contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. – *Molecular Ecology* **16**: 2542–2559.
- EVANNO G., REGNAUT S. & GOUDET J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. – *Molecular Ecology* **14**: 2611–2620.
- EXCOFFIER L. & LISCHER H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. – *Molecular Ecology Resources* **10**: 564–567.
- FAHSELT D. 2007. Is transplanting an effective means of preserving vegetation? – *Canadian Journal of Botany* **85**: 1007–1017.
- FALUSH D., STEPHENS M. & PRITCHARD J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. – *Molecular Ecology Notes* **7**: 574–578.
- FORT N. 2006. Ex situ conservation at the Conservatoire Botanique National Alpin. International Alpine and Arctic Congress of Botanical Garden, Villar d'Arène Col du Lautaret, 6–9 September 2006.
- GODEFROID S., PIAZZA C., ROSSI G., BUORD S., STEVENS A. D., AGURAIUJA R., COWELL C., WEEKLEY C. W., VOGG G., IRONDO J. M., JOHNSON I., DIXON B., GORDON D., MAGNANON S., VALENTIN B., BJUREKE K., KOOPMAN R., VICENS M., VIREVAIRE M. & VANDERBORGH T. 2011. How successful are plant species reintroductions? – *Biological Conservation* **144**: 672–682.
- GOLDBLATT P. 1996. *Gladiolus* in Tropical Africa: systematics, biology & evolution. s. 338. Timber Press, Portland, Oregon.
- GOLDBLATT P. & MANNING J. 1999. *Gladiolus* in Southern Africa. s. 464. Timber Press, Portland, Oregon.
- HAMILTON A. P. 1980. *Gladiolus* L. – W: T. G. TUTIN, V. H. HEYWOOD, N. A. BURGESS, D. M. MOORE, D. H. VALENTINE, S. M. WALTERS & D. A. WEBB (red.), *Flora Europaea*. **5**. *Alismataceae* to *Orchidaceae* (*Monocotyledones*), s. 101–102. Cambridge University Press, Cambridge.
- HERRMANN D., PONCET B. N., MANEL S., RIOUX D., GIELLY L., TABERLET P. & GUGERLI F. 2010. Selection criteria for scoring amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) positively affect the reliability of population genetic parameter estimates. – *Genome* **53**(4): 302–310.
- KAMIŃSKI R. 2004. *Aldrovanda vesiculosa* L., Aldrovanda pęcherzykowata. – W: B. SUDNIK-WÓJCIKOWSKA B. & H. WERBLAN-JAKUBIEC (red.), *Gatunki roślin. Poradniki ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręcznik metodyczny. Tom 9*, s. 75–80. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- KAMIŃSKI R. 2012. Mieczyk błotny, *Gladiolus paluster* Gaudin. – W: J. PERZANOWSKA (red.), *Monitoring gatunków roślin. Przewodnik metodyczny. Część II*, s. 169–183. Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, Warszawa.
- KĄŻMIERCZAKOWA R. 2003. Stan introdukowanych populacji dziewięciszła popłocholistnego na Wyżynie Miechowskiej. – *Chrońmy Przyrodę Ojczystą* **59**(1): 11–23.
- KĄŻMIERCZAKOWA R. 2004. *Carlina onopordifolia* Besser, Dziewięciszł popłocholistny. – W: B. SUDNIK-WÓJCIKOWSKA & H. WERBLAN-JAKUBIEC (red.), *Gatunki roślin. Poradniki ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręcznik metodyczny. Tom 9*, s. 96–99. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- KIRÁLY G. (red.). 2007. Vörös Lista: A magyarországi edényes flóra veszélyeztetett fajai [Red list of the vascular flora of Hungary]. s. 73. Saját kiadás, Sopron.
- KORNECK D., SCHNITTLER M. & VOLLMER I. 1996. Rote Liste der Farn- und Blütenpflanzen (Pteridophyta et Spermatophyta) Deutschlands. – *Schriftenreihe für Vegetationskunde* **28**: 21–187.

- KRAUSS S. L., DIXON B. & DIXON K. W. 2002. Rapid genetic decline in a translocated population of the endangered plant *Grevillea scapigera*. – *Conservation Biology* **16**(4): 986–994.
- KULCZYŃSKI S. 1919. *Gladiolus* L. – W: M. RACIBORSKI & W. SZAFER (red.), Flora polska. Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych **1**, s. 146–148. Nakładem Akademji Umiejętności, Kraków.
- KÜHLING L. 1866. Verzeichniss der in Bromberg's Umgegend wild wachsenden phanerogamischen Pflanzen. – *Schriften der Physikalisch-Ökonomische Gesellschaft* **7**: 1–29.
- MANNING J., GOLDBLATT P. & SNIJMAN D. 2002. The color encyclopedia of Cape Bulbs. s. 486. Timber Press, Portland, Oregon.
- MATUSZKIEWICZ W. 2005. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. s. 537. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- MEREĎA P. JUN. & HODÁLOVÁ I. 2011. Cievnaté rastliny – Vascular plants. – W: L. AMBRÓS, T. ČEJKA, J. ČERNÝ, A. DAROLOVÁ, I. HODÁLOVÁ, J. KRÍŠTOFÍK, A. KUBINSKÁ, K. MIŠÍKOVÁ, P. MEREĎA JUN., R. ŠOLTÉS, D. ŠUBOVÁ & L. VIDLIČKA (red.), The Atlas of the Species of European interest for NATURA 2000 sites in Slovakia, s. 6–119. Slovart, Bratislava.
- MEUSEL H., JÄGER E. J. & WEINERT E. 1965. Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. s. 583. Gustav Fischer, Jena.
- MILLER H. 1902. Beitrag zur Flora des Kreises Schubin. *Zeitschrift der Botanischen Abteilung*. Bd.8. s. 87.
- MIREK Z., PIĘKOŚ-MIREK H., ZAJĄC A. & ZAJĄC M. 2002. Flowering plants and pteridophytes of Poland – a checklist. – W: Z. MIREK (red.), Biodiversity of Poland **1**, s. 442. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- MOSER D., GYGAX A., BÄUMLER B., WYLER N. & PALESE R. 2002. Rote Liste der gefährdeten Farn- und Blütenpflanzen der Schweiz. Hrsg. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern & Zentrum des Datenverbundnetzes der Schweizer Flora, Chambésy & Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Chambésy. BUWAL-Reihe 'Vollzug Umwelt'.
- NEI M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- NEI M. & LI W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. – *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**: 5269–5273.
- PETROVA A. & VLADIMIROV V. (red.). 2009. Red list of Bulgarian vascular plants. – *Phytologia Balcanica* **15**(1): 63–94.
- PFUHL F. 1896. Die bisher in der Provinz Posen nachgewiesenen Gefässpflanzen. – *Zeitschrift der Botanischen Abteilung*. Bd. 3. s. 57.
- PREUSS H. 1883. Bericht über die 22. Versammlung des preussischen botanischen Vereins zu Marienburg in Westpr. am 9. October 1883. s. 78. Königsberg.
- PROCHÁZKA F. (red.). 2001. Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). – *Příroda* **18**: 1–166.
- RONIKIER M., CIEŚLAK E. & KORBECKA G. 2008. High genetic differentiation in the alpine plant *Campanula alpina* Jacq. (*Campanulaceae*): evidence for glacial survival in several Carpathian regions and long-term isolation between the Carpathians and the Alps. – *Molecular Ecology* **17**: 1763–1775.
- SCHLÜTER P. M. & HARRIS S. A. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. – *Molecular Ecology Notes* **6**(2): 569–572.
- SCHMITT B., FARTMANN T. & HÖLZEL N. 2010. Vergesellschaftung und Ökologie der Sumpf-Siegwurz (*Gladiolus palustris*) in Südbayern. – *Tuexenia* **30**: 105–127.
- VALENTE L. M., SAVOLAINEN V., MANNING J. C., GOLDBLATT P. & VARGAS P. 2011. Explaining disparities in species richness between Mediterranean floristic regions: a case study in *Gladiolus* (*Iridaceae*). – *Global Ecology and Biogeography* **20**: 881–892.

- VAN DE PEER Y. & DE WACHTER R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Bioinformatics*.
- VANDER MIJNSBRUGGEA K., BISCHOFF A. & SMITH B. 2010. A question of origin: Where and how to collect seed for ecological restoration. – *Basic and Applied Ecology* **11**(4): 300–311.
- VOLIS S., DORMAN M., BLECHER M., SAPIR Y. & BURDENIY L. 2011. Variation partitioning in canonical ordination reveals no effect of soil but an effect of co-occurring species on translocation success in *Iris atrofusca*. – *Journal of Applied Ecology* **48**: 265–273.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER R., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRITERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. & ZABEAU M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acids Research* **23**: 4407–4414.
- WALTER K. S. & GILLET H. J. (red.). 1998. 1997 IUCN red list of threatened plants. s. 862. Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. IUCN – The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- WEEKS A. R., SGRO C. M., YOUNG A. G., FRANKHAM R., MITCHELL N. J., MILLER K. A., BYRNE M., COATES D. J., ELDRIDGE M. D. B., SUNNUCKS P., BREED M. F., JAMES E. A. & HOFFMANN A. A. 2011. Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. – *Evolutionary Applications* **4**(6): 709–725.
- ZAJĄC A. & ZAJĄC M. (red.). 2001. Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce. s. xii + 714. Nakładem Pracowni Chorologii Komputerowej Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.
- ZARZYCKI K. & SZELĄG Z. 2006. Red list of the vascular plants in Poland. – W: Z. MIREK, K. ZARZYCKI, W. WOJEWODA & Z. SZELĄG (red.), Red list of plants and fungi in Poland, s. 11–20. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- ZARZYCKI K. & WOJEWODA W. (red.). 1986. Lista roślin wymierających i zagrożonych w Polsce. s. 128. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.

SUMMARY

The natural range of *Gladiolus paluster* is characterized by a considerable dispersal of localities and in European countries the species is rare or very rare (BERDOWSKI 2004; BILZ *et al.* 2011). In addition, the adverse changes in the natural habitat of this species such as drainage of the sites and their change into arable land, overgrowing by expansive plants or collecting of flowering individuals of the species by people, contribute to its populations decline. Due to poor populations' condition, *G. paluster* was included into the group of species threatened with extinction in Europe and was listed in the Annex II of the Habitats Directive. Based on recent monitoring reports from the year 2008 (under art. 17 of the EU Habitats Directive) it can be concluded that the condition of the European population of *G. paluster* is very bad. There is no information whether the species has somewhere any strong and abundant population. Only in Italy the country's population condition has been assessed as appropriate (FV; indicators of population status according to the guidelines from ANONYMOUS 2005), while in Poland, the Czech Republic, Slovakia, France and Hungary it is rated as bad (U2). Status of the *G. paluster* population in other European countries was classified as unsatisfactory (U1).

In Poland, *Gladiolus paluster* is one of the rarest and most endangered of extinction plant species. In the *Polish Red Data Book of Plants* it is classified as critically endangered (BARYŁA & CZYŁOK 2001) and it is strictly protected species according to national law (BERDOWSKI 2004). The species was reported from ca. 20 localities, mainly in the 19th century in the north-west and south-west of today's Poland (KÜHLING 1866; PREUSS 1883; ABROMEIT 1892, 1897; ABROMEIT *et al.* 1940; PFUHL 1896; MILLER 1902; BOCK 1908; ZAJĄC & ZAJĄC 2001; BERDOWSKI 2004). Currently, occurrence of *G. paluster* was confirmed only in one locality in the "Łąka Sulistrowicka" reserve on the Radunia Mt. within the Ślęza Mt. massif in the Sudety Foothills (Lower Silesia) (KAMIŃSKI 2012). This locality of *G. paluster* was subjected to monitoring (KAMIŃSKI 2012).

Due to a drastically reduced number of *Gladiolus paluster* population in Poland, species restoration actions were initiated. Restoration project was started in 2004 by the Botanical Garden of the Wrocław University (it is an entity specializing in the *ex situ* species conservation). Seeds derived from several, surviving individuals of *G. paluster* from natural population in the “Łąka Sulistrowicka” reserve were collected in 2004 and sown in *ex situ* culture in Botanical Garden of Wrocław University. Plants which grew from these seeds were analyzed morphologically. On the basis on morphological characters *G. paluster*, *G. imbricatus* and putative hybrids between this species were determined within *ex situ* culture.

In subsequent years, all individuals derived from seeds were subject to selection and propagated in *ex situ* culture. In 2009 part of the individuals of *Gladiolus paluster* was reintroduced into their natural population and introduced into several new sites located mostly in the Lower Silesia (south-western Poland). Additionally in 2011, the Polish Society for Nature Protection “Salamandra” has begun treatments for restitution of *G. paluster* in the northern Poland (within the framework of the POIS.05.01.00-00-329/10 project, funded by the European Union and the national funding). Ca. 5,000 bulbs of *G. paluster* bred in Botanical Garden, were introduced in autumn 2013 into 10 restored sites in Krajna and Paluki areas, located within the former range of the species in the north-western Poland (KAMIŃSKI 2012).

Considering the fact that seeds from only several individuals of *Gladiolus paluster* from natural population in “Łąka Sulistrowicka” were founders for plants in *ex situ* culture, it was appropriate to determine the level of “initial” genetic diversity for the newly created restored and natural populations of this species. Such studies are crucial for the management optimization of restitution of endangered and rare species (KRAUSS *et al.* 2002; VAN DER MIJNSBRUGGEA *et al.* 2010; WEEKS *et al.* 2011). Hence, in the present studies we used the DNA fingerprinting technique of amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) to assess genetic diversity of *G. paluster* individuals maintained in *ex situ* culture in Botanical Garden of Wrocław University. We also determined in this way the genetic relationships between individuals of *G. paluster*, *G. imbricatus* and putative hybrids.

The obtained results confirmed that *Gladiolus paluster* and hybrids of *G. paluster* and *G. imbricatus* occur in *ex situ* culture. Individuals of *G. paluster* are characterized by a significantly lower genetic diversity than *G. imbricatus* individuals from natural populations. Only 10% AFLP loci were polymorphic in *G. paluster* whereas in *G. imbricatus* there were 38% of polymorphic loci. Nei’s gene diversity was five times lower in *G. paluster* ($H_j = 0.02$) than in *G. imbricatus* ($H_j = 0.11$; Table 2). These both species are outcrossing, so it seems that the values of the parameters characterizing their genetic diversity should be similar. However, it should be emphasized that the observed low genetic polymorphism of *G. paluster* in cultivation may not reflect the real level of genetic diversity of species within natural populations, where new genotypes can arise as a result of random mating. In order to unambiguously confirm this suggestion, comparison with the level of genetic diversity of natural populations of *G. paluster* within European range is needed. Our results revealed that individuals of *G. paluster* derived from “Łąka Sulistrowicka” were genetically distinct from individuals of *G. paluster* (Gpa-WR0401, Gpa-WR0402) originated from the German population (Fig. 1, Table 1).

NJ tree revealed three well-supported (bootstrap value of 100%) clusters corresponding to *Gladiolus paluster*, *G. imbricatus* and hybrids (Fig. 1). A similar pattern of genetic differentiation was shown by PCoA where putative hybrids were intermediate positioned among *G. paluster* and *G. imbricatus* (Fig. 2). Bayesian analyses showed the presence of separate gene pools of *G. paluster* and *G. imbricatus* and mixed gene pool of hybrids (Fig. 3). It was clearly shown that all individuals from cultivation previously identified as *G. imbricatus* based on morphological characters, are hybrids of *G. paluster* and *G. imbricatus* (Figs 1, 3). We suggest that hybridization took place already at the natural locality in the “Łąka Sulistrowicka”, from where seeds were collected.

Restoration efforts have resulted in the preservation of the native genotypes of *Gladiolus paluster* in *ex situ* culture in Botanical Garden of Wrocław University with a known level of individuals’ genetic diversity. We have *ex situ* propagated bulbs which can potentially be used now and in the future in natural and restored populations. We recommend simultaneous and long-term monitoring of natural and restored populations of *G. paluster* to identify parameters increasing restoration success.

Przyjęto do druku: 08.05.2014 r.