

Czy introdukcja *Groenlandia densa* (Potamogetonaceae) w Polsce ma szanse powodzenia?

WOJCIECH PUCHALSKI, ELŻBIETA CIEŚLAK, JUSTYNA NOWAK
i WALDEMAR ŻUKOWSKI

PUCHALSKI, W., CIEŚLAK, E., NOWAK, J. AND ŻUKOWSKI, W. 2016. What is the chance for successful introduction of *Groenlandia densa* (Potamogetonaceae) in Poland? *Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica* 23(2): 289–304. Kraków. e-ISSN 2449-8890, ISSN 1640-629X.

ABSTRACT: *Groenlandia densa* (L.) Fourr ranks as critically endangered in Poland. It was noted sporadically until 1987 but has not been confirmed more recently. For this reason, reintroduction of this species to Pomeranian waters (N Poland) from its remaining populations in northern Germany has been planned. This study examined the genetic structure of *G. densa*, considered the suitability of the remaining German populations as a potential source for its introduction to Poland, and assessed the likelihood of success of such assisted colonisation. A comparison of the genetic structure of all studied populations revealed high genetic similarity and no genetic differentiation between samples from Poland (historical site) and from Germany. This indicates that each studied population from Germany may be used as stock for introduction. At the same time, some mostly uncertain factors leading to the observed recent extinction of *G. densa* from most of its northern European range, including the declining intensity and quality of groundwater seepage, suggest that the effect of this introduction may be very short-lived.

KEY WORDS: *Groenlandia densa*, rare species, assisted colonisation, genetic structure, genetic diversity, Germany, Poland

W. Puchalski, Pracownia Natury, Sosnowa 8, 95-050 Konstancin Łódzki, Polska; e-mail: pracownia.natury@wp.pl

E. Cieślak, J. Nowak, Instytut Botaniki im. Władysława Szafera Polskiej Akademii Nauk, ul. Lubicz 46, 31-512 Kraków, Polska; e-mail: e.cieslak@botany.pl, j.helmecka@botany.pl

W. Żukowski, Instytut Biologii Środowiska, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań, Polska; e-mail: zukowski@amu.edu.pl

WSTĘP

Groenlandia densa (L.) Fourr. (rdestniczka gęsta) jest wodną byliną o zasięgu alpejsko-atlantycko-śródziemnomorskim z centrum występowania w zachodniej Europie. Oderwane, górskie (do 1900 m n.p.m.) lub wyżynne stanowiska sięgają w Azji Mniejszej do Armenii i północno-zachodniego Iranu oraz do północnych krańców Afryki (KHANJAN 2004; GHRABI-GAMMAR i in. 2009; YENIYURT & HEMMAMI 2011; AKHANI 2014; EPRE-MÂN & KOBELÂN 2015; YOUSEFI & TORANJ 2015). Siedliskiem tej rośliny są płytkie wody

zarówno pływające, jak i stojące. Oprócz naturalnego środowiska, gatunek uprawiany jest również w warunkach sztucznych, np. w ogrodach.

Groenlandia densa zwykle posiada zimozielone pędy, słabo rozgałęzione, mogące osiągać długość nawet 1 m. Blaszki liściowe mają kształt eliptyczny i są ułożone naprzeciwległe. Jej kwiaty są drobne i zebrane w kwiatostany, kwitnie od czerwca do sierpnia. Owocem jest niełupka o długości około 3 mm z charakterystycznym haczykowatym dzióbkiem i ostrym skrzydełkiem (ŻUKOWSKI 2014).

Dane zamieszczone w publikacjach wskazują, że *Groenlandia densa* wymarła na wielu stanowiskach. Informacje o regionalnym zanikaniu populacji rdestniczki w południowej Szwecji (SWEDISH SPECIES INFORMATION CENTRE PUBLISHED) i Norwegii podawano już w końcu XIX w. Z kolei w Wielkiej Brytanii zanikanie stanowisk gatunku odnotowano w latach 30. XX w. Natomiast szczególne przyspieszenie tego procesu zaobserwowano pod koniec XX w., kiedy to liczba stanowisk zmniejszyła się o około 60% (DUCKWORTH i in. 2002). W Danii, według danych Międzynarodowej Unii Ochrony Przyrody (IUCN), *G. densa* jest gatunkiem wymarłym (AKHANI 2014), przy czym „czerwona lista” tego kraju (FAGDATACENTER FOR BIODIVERSITET OG TERRESTRISK NATUR) wskazuje na możliwość zachowania pojedynczych stanowisk w Jutlandii. Na Litwie gatunek ten ma status gatunku wymarłego (LIETUVOS RAUDONOJI KNYGA 2007). W Niemczech, w dolinach dolnej Wezery i Renu, prawdopodobnie też Eider i dolnej Łaby (FLORAWEB; VAN DE WEYER 1989, 1992) zachowały się pojedyncze reliktowe lokalizacje, a na terenie wschodnich Niemiec uznawany jest za gatunek wymarły (FLORAWEB; REMY 2011). Natomiast w regionach alpejskich (JÄGER 2013, 2014) oraz subalpejskich (HOHLA 2012) nie zaobserwowano istotnego spadku liczebności stanowisk rdestniczki i na tych obszarach nie jest ona gatunkiem zagrożonym.

Zachodzące na terenie Polski niekorzystne zmiany, związane z zanikaniem stanowisk rdestniczki, były zauważane od dawna. Liczne XIX-wieczne stanowiska *Groenlandia densa* z okolic Gdańska są już uznane za historyczne (ŻUKOWSKI 2001). Jednak jeszcze w niedalekiej przeszłości był to gatunek rzadki, ale obecny na rozproszonych stanowiskach w północnej części kraju. W związku z tym, *G. densa* otrzymała status gatunku rzadkiego (JASIEWICZ 1981), następnie została wpisana na *Listę roślin wymierających i zagrożonych w Polsce*, początkowo jako gatunek o nieokreślonym stopniu zagrożenia (I) (ZARZYCKI i in. 1986), a w kolejnej edycji jako gatunek wymierający – krytycznie zagrożony (E) (ZARZYCKI & SZELĄG 2006). Potwierdzenie obecności *G. densa* na pojedynczych stanowiskach w wodach Pomorza w latach 80. XX w. pozwoliło na utrzymanie statusu tego gatunku jako krytycznie zagrożonego (CR) w obu edycjach *Polskiej Czerwonej Księgi Roślin* (ŻUKOWSKI 2001, 2014). Przy czym ostatnie potwierdzone notowanie *G. densa* z obszaru środkowego Pomorza pochodzi z 1987 r. (ŻUKOWSKI 2001). Późniejsze próby odnalezienia tego gatunku w tych w rejonach, podjęte przez autorów niniejszej pracy (PUCHALSKI 2004; Puchalski i Żukowski inf. własne z badań terenowych z 2015 r.), nie przyniosły pozytywnych rezultatów.

W trakcie przygotowywania polskiego poradnika ochrony siedlisk i gatunków *Natura 2000* (HERBICH 2004), nie stwierdzono występowania *Groenlandia densa* na terenie Polski, gatunku niekiedy wykazywanego z siedlisk określanych jako „nizinne i podgórskie rzeki ze zbiorowiskami włosieniczników” (3260 w systemie *Natura 2000*). Został on jednak

niewłaściwie wpisany w polskim podręczniku jako jeden z gatunków charakterystycznych dla tego siedliska (PUCHALSKI 2004), co – w przypadku potwierdzenia wymarcia gatunku na obszarze Polski – skłaniało do podjęcia prac związanych z jego introdukcją do wód Pomorza. Koncepcja ta początkowo dotyczyła tylko sztucznych ekosystemów (np. związanych z elektrowniami wodnymi starych koryt rzecznych czy rowów melioracyjnych), gdzie warunki środowiskowe odpowiadałyby najbliższemu geograficznie, zachowanym stanowiskom rdestniczki w północnych Niemczech (GARNIEL 1999) czy w zbiornikach wodnych przy elektrowni Gabčíkovo na Słowacji (OT’AHEL’OVÁ i in. 2007). Takie działanie, w celu przeprowadzenia prac związanych z introdukcją *G. densa*, wpisywało się w modny wówczas w ekologii rekultywacyjnej trend w stosunku do gatunków, które w niedalekiej przeszłości, w określonych ekosystemach i regionach wymarły w wyniku oddziaływania czynników antropogenicznych, takich jak zanieczyszczenia, eutrofizacja czy przekształcenia wynikające z intensyfikacji gospodarowania.

Regionalna Dyrekcja Ochrony Środowiska w Szczecinie zaplanowała wykonanie prac związanych z introdukcją rdestniczki w rzekach Pomorza w ramach programu zgłoszonego w 2013 r. do finansowania przez europejski program LIFE. Prace w terenie poprzedzono studium obejmującym przegląd literatury i danych, dotyczących aktualnego występowania tego gatunku w Europie. Stwierdzono, że najbliższe polskiemu stanowiskom *Groenlandia densa* są te znajdujące się w Niemczech. Przeprowadzono również krótkoterminowe obserwacje zachowanych reliktowych stanowisk rdestniczki w północnych Niemczech oraz stanowisk w regionie alpejskim i subalpejskim w Austrii i Bawarii, uważanych za niezagrożone i znacznie lepiej zachowane (JÄGER 2014). Uzyskane dane były punktem wyjścia do próby określenia przyczyn stwierdzonego masowego zaniku stanowisk tego gatunku w Polsce i szerzej w północno-wschodniej części jego zasięgu geograficznego.

W związku z obserwowaną dysjunkcją między południowo- a północno-niemieckimi obszarami występowania *Groenlandia densa* (FLORAWEB), dużą różnorodnością siedlisk w jakich ten gatunek jest spotykany oraz szerokim zakresem zmienności morfologicznej pędów, podjęto badania genetyczne, mające na celu określenie poziomu zmienności i/lub zróżnicowania genetycznego populacji tego gatunku, położonych najbliżej Polski.

Podstawowymi celami pracy było: (1) ustalenie poziomu podobieństwa genetycznego między osobnikami *Groenlandia densa* z Niemiec oraz ze stanowisk w Polsce; (2) wskazanie potencjalnych, źródłowych populacji z Niemiec dla ewentualnej introdukcji *G. densa* na teren Polski; (3) podjęcie próby oceny powodzenia introdukcji rdestniczki na stanowiska w Polsce.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach genetycznych uwzględniono próby z populacji obecnie występujących oraz z okazów zielnikowych. Materiał z różnych lokalizacji na terenie Niemiec zebrano w 2015 r. Płaty *Groenlandia densa*, z których pobierano próby w poszczególnych populacjach, znajdowały się w odległości około 0,5 km od siebie. Materiał z Polski był wybierany ze zbiorów zielnikowych. Po weryfikacji krajowych zielników oraz rewizji taksonomicznej, do badań wytypowano okaz z herbarium Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu (POZ), pochodzący z Pomorza Zachodniego (Tab. 1), który został przekazany do zielnika Instytutu Botaniki PAN (KRAM). Pojedynczą próbę do analiz genetycznych stanowił fragment łodygi z liśćmi. Okazy z populacji po zebraniu zostały zasuszone w żelu krzemionkowym. Z populacji nr 23 dwie

Tabela 1. Stanowiska zbioru prób *Groenlandia densa* uwzględnionych w analizach sekwencjonowania regionów DNA jądrowego i chloroplastowego**Table 1.** Localities of *Groenlandia densa* population samples included in sequencing analyses of nuclear and chloroplast DNA regions

Kod populacji (Code of the population)	Stanowisko (Locality)
G-10	Niemcy, Saksonia-Anhalt, pld. Harz; staw źródłiskowy w Einzingen w centrum wsi, obudowany, prawdopodobnie na miejscu dawnej niecki źródłiskowej, 13.10.2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631511 (Germany, Saxony-Anhalt, Southern Harz Mts.; a spring pond in the center of Einzingen village, enclosed, probably on the site of the former limnocene basin, 13 Oct 2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631511)
G-21	Niemcy, Dolna Saksonia; rowy melioracyjne na łąkach pod Osterholz-Scharmbeck; gęste osady żelaziste w płacie z <i>Groenlandia densa</i> , 15.10.2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631503, 631504 (Germany, Lower Saxony; drainage ditches in the meadows in Osterholz-Scharmbeck; dense ferruginous sediments present in a patch of <i>G. densa</i> , 15 Oct 2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631503, 631504)
G-22	Niemcy, Dolna Saksonia; rowy melioracyjne na łąkach pod Osterholz-Scharmbeck; pojedyncze, owocujące okazy <i>Groenlandia densa</i> w płacie z mniej obfitymi osadami żelazistymi, 15.10.2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631507, 631506, 631505 (Germany, Lower Saxony; drainage ditches in the meadows in Osterholz-Scharmbeck; single fruiting individuals of <i>G. densa</i> in the patch with less abundant ferruginous sediments, 15 Oct 2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631507, 631506, 631505)
G-23	Niemcy, Dolna Saksonia; rowy melioracyjne na łąkach pod Osterholz-Scharmbeck; płat z <i>Groenlandia densa</i> w odległości ok. 400 m od początku rowu, 15.10.2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631508, 631509, 631515, 631516 (Germany, Lower Saxony; drainage ditches in the meadows in Osterholz-Scharmbeck; a patch <i>G. densa</i> ca 400 m from the beginning of the ditch, 15 Oct 2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski KRAM 631508, 631509, 631515, 631516)
G-31	Niemcy, Nadrenia Pn.-Westfalia, skraj doliny Renu koło Wesel; rów przy drodze, k. Hamminkeln, w otoczeniu łąki, 16.10.2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631512, 631513 (Germany, North-Rhine-Westphalia, the edge of the Rhine river floodplain near Wesel; a ditch beside the road, near Hamminkeln, surrounded by meadows, 16 Oct 2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631512, 631513)
G-32	Niemcy, Nadrenia Pn.-Westfalia, skraj doliny Renu koło Wesel; poprzeczny rów na ekstensywnych, koszonych łąkach w dolinie Issel k. Ringenberg, 16.10.2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631510, 631514 (Germany, North-Rhine-Westphalia, the edge of the Rhine river floodplain near Wesel; a transversal ditch in extensive, mown meadows in the floodplain near Issel by Ringenberg, 16 Oct 2015, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Puchalski, KRAM 631510, 631514)
G-50	Polska, Pomorze Zachodnie; Rytel, w Brdzie, na południe od miejscowości, 08.08.1983, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Żukowski, KRAM 631502 (Poland, Western Pomerania; Rytel, in the Brda river, south of Rytel village, 8 Aug 1983, <i>leg.</i> , <i>det.</i> W. Żukowski, KRAM 631502)

próby reprezentowały osobnika klonalnego (23-1a oraz 23-1b; Tab. 1). Całkowita liczba analizowanych prób wynosiła 27. W celu dokumentacji, fragmenty badanych okazów *G. densa* zdeponowano w zielniku Instytutu Botaniki Polskiej Akademii Nauk w Krakowie (KRAM).

Izolacja DNA

Całkowite DNA zostało wyizolowane zestawem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), zgodnie z protokołem podanym przez producenta. Jakość oraz ilość DNA sprawdzono na 1% żelu agarozowym. Izolaty pochodzące z materiałów zielnikowych dodatkowo oczyszczono za pomocą zestawu DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research), według procedury producenta.

Sekwencjonowanie DNA jądrowego i chloroplastowego

Sekwencjonowanie wykonano metodą z fluorescencyjnie znakowanymi terminatorami reakcji (metoda Sanger). Przy wyborze primerów DNA kierowano się danymi z bazy GenBank (NCBI) oraz własnymi badaniami pilotażowymi. Na tej podstawie analizą objęto jądrowy region DNA – ITS (primery ITS2, ITS3 i ITS4; WHITE i in. 1990 oraz ITSa-ITSd; BLATTNER 1999) oraz trzy fragmenty chloroplastowego DNA – *psbA-trnH* (SHAW i in. 2007), *rpS12-rpL20* (SHAW i in. 2005) i *atpB-rbcL* (CHUNG i in. 2007).

Dużą trudność w analizach laboratoryjnych nastęczał materiał pochodzący z okazu zielnikowego. Wstępny etap prac dotyczył opracowania protokołu reakcji sekwencjonowania dla wybranych fragmentów DNA, który obejmował ustalenie warunków poszczególnych reakcji PCR oraz testy różnych typów polimeraz.

Do amplifikacji regionu ITS prób pochodzących z materiału świeżego wykorzystano startery ITSa-ITS4 w połączeniu z polimerazą AmpliTaq® DNA (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.). Zastosowano następujące warunki reakcji: denaturacja wstępna 94°C przez 3 min., następnie 10 cykli obejmujących 94°C przez 30 s, 60°C przez 30 s, uwzględniające spadek temperatury o 1°C w każdym cyklu, 72°C przez 1 min., kolejne 25 cykli obejmujących 94°C przez 30 s, 50°C przez 30 s, 72°C przez 1 min. oraz elongacja końcowa 72°C przez 4 min. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 µl, w tym standardowa ilość matrycy DNA, czyli 1 µl, a stężenie pozostałych składników odpowiednio – 1× bufor do polimerazy (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.), 2,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.), 0,12 mM dNTP (Sigma-Aldrich® Co.), 0,3 µM każdego z primerów, 1 U polimerazy oraz 0,8% BSA o stężeniu 1 mg/ml (New England BioLabs® Inc.). W przypadku prób, dla których uzyskano negatywny wynik powyższej reakcji PCR, przeprowadzono ponownie reakcję PCR przy zachowaniu tych samych parametrów, stosując AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.).

W przypadku prób zielnikowych, amplifikacja regionu ITS (ITSa-ITS4) została przeprowadzona w takich samych warunkach, jak dla materiału świeżego. Na skutek braku pozytywnego wyniku dla tej reakcji, przeprowadzono powtórnie analizę PCR, zwiększając w mieszaninie reakcyjnej objętość DNA do 4 µl oraz wykorzystując polimerazę AmpliTaq® Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.). Dodatkowo, w przypadku analiz prób z materiału zielnikowego, wykorzystano startery wewnętrzne ITS: ITSa-ITS2 oraz ITS3-ITS4. Zastosowano te same parametry reakcji PCR i objętości DNA (1µl), jak w przypadku analizy świeżego materiału. Dla fragmentu ITS3-ITS4 wykonano również test z zastosowaniem warunków reakcji PCR według SHAW i in. (2007), przy użyciu AmpliTaq® Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.) oraz RedTaq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich® Co.), a także warunków według SABOVLEVIĆ i FRAHM (2011) z wykorzystaniem RedTaq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich® Co.). W przypadku materiału zielnikowego, dla którego otrzymano negatywny wynik reakcji PCR, wykonano kolejną analizę, z użyciem AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich® Co.), z zastosowaniem programu sugerowanego przez producenta.

W amplifikacji chloroplastowego fragmentu *psbA-trnH* prób z materiału świeżego wykorzystano program i parametry według SHAW i in. (2007). W pierwszej kolejności zastosowano RedTaq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich® Co.), następnie AmpliTaq® DNA Polymerase oraz AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.). Dla prób, które dały negatywny

wynik w powyższych reakcjach PCR użyto programu według ROKNIERA i in. (2008) oraz polimerazy AmpliTaq® DNA Polymerase i AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.), a stężenie poszczególnych reagentów w mieszaninie reakcyjnej wynosiło odpowiednio – 1 µl matrycy DNA, 1× bufor do polimerazy (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.), 2,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.), 0,12 mM dNTP (Sigma-Aldrich® Co.), 0,2 µM każdego ze starterów, 1,5 U polimerazy oraz 0,2 µl BSA o stężeniu 1 mg/ml (New England BioLabs® Inc.).

Amplifikację regionu *psbA-trnH* w przypadku prób zielnikowych przeprowadzono z wykorzystaniem programu zgodnie z SHAW i in. (2007) i polimerazy AmpliTaq® Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.). Próby, dla których otrzymano negatywny wynik reakcji, amplifikowano następnie przy użyciu polimerazy AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich® Co.), z uwzględnieniem programu dedykowanego przez producenta oraz RedTaq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich® Co.) w połączeniu z programem według SABOVLJEVIĆ i FRAHM (2011).

Fragment chloroplastowego fragmentu *rpS12-rpL20* dla prób z materiału świeżego amplifikowano z wykorzystaniem AmpliTaq® DNA Polymerase oraz AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.) i programu oraz parametrów zgodnie z publikacją ROKNIERA i in. (2008). Równolegle testowano polimerazę PicoMaxx DNA Polymerase (Agilent Technologies) oraz AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich® Co.). W obu przypadkach użyto programów proponowanych przez producenta.

W amplifikacji chloroplastowego fragmentu *rpS12-rpL20* z próby zielnikowej zastosowano kolejne takie same etapy analiz, jakie przeprowadzono dla tej grupy prób w przypadku regionu *psbA-trnH*. Dla prób, dla których otrzymano po wszystkich przeprowadzonych reakcjach wynik negatywny, wykonano dodatkowo reakcję PCR z zastosowaniem polimerazy RedTaq DNA (Sigma-Aldrich® Co.) w połączeniu z programem według ROKNIERA i in. (2008).

Fragment *atpB-rbcL* amplifikowano z użyciem polimerazy AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.) i programu według SHAW i in. (2007). W przypadku negatywnych wyników reakcji PCR, w kolejnych analizach użyto polimerazy AmpliTaq® 360 DNA Polymerase i AmpliTaq® Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.) oraz zwiększono w mieszaninie reakcyjnej objętość DNA do 4 µl. Dodatkowo zastosowano PicoMaxx DNA Polymerase (Agilent Technologies) oraz AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich® Co.) z użyciem programów zalecanych przez producentów. Analizy sekwencji DNA z okazji zielnikowego przeprowadzono w duplikatach, z uwzględnieniem dwóch prób kontrolnych.

Enzymatyczne oczyszczanie produktów PCR wykonano za pomocą przygotowanej mieszaniny enzymów egzonukleazy I o stężeniu wyjściowym 10 U/µl (EURx®) oraz kretkowej fosfatazy alkalicznej (Affymetrix®) o stężeniu wyjściowym 1 U/µl, zgodnie z wytycznymi producentów. Reakcję sekwencjonowania dla wszystkich regionów przeprowadzono w dwóch kierunkach i wykonano z użyciem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.) oraz dodatkowego buforu BDX64 (BigDye® Enhancing Buffer, MCLAB). Zastosowane warunki analizy oraz objętości poszczególnych reagentów były zgodne z rekomendacją producenta buforu BDX64, przy 32-krotnym rozcieńczeniu BigDye® Terminator v3.1. Wszystkie etapy przeprowadzono w termocyklach GeneAmp® PCR System lub Veriti 96-well (Applied Biosystems®). Następnie wykonano precypitację przy użyciu EDTA/EtOH, po czym próby zawieszono w 12 µl formamidu (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc.). Po dodatkowej denaturacji termicznej (95°C przez 2 min.) i schłodzeniu prób w lodzie, przeprowadzono rozdział na sekwencjonerze kapilarowym ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems®) z wykorzystaniem 36 cm kapilar oraz polimeru POP-7.

Analiza sekwencji DNA

Sekwencje zostały opracowane i wyrównane za pomocą programu BIOEDIT 7.1.3 (HALL 1999). Liczbę, frekwencję i zależności pomiędzy haplotypami ustalono z wykorzystaniem programu TCS 1.21 (CLEMENT i in. 2000; POSADA & CRANDALL 2001). Program ten tworzy sieć połączeń między haplotypami

na podstawie algorytmu parsymonii (ang. *parsimony algorithm*). W celu potwierdzenia powtarzalności otrzymanych danych dla pojedynczych osobników z populacji wykonano powtórzną reakcję amplifikacji. Nie stwierdzono różnic pomiędzy powtórzeniami oraz porównaniami sekwencji z końców 5'–3' oraz 3'–5' łańcucha nukleotydowego. Sekwencje badanych fragmentów złożono w bazie GenBank (nr KY214144–KY214178 oraz KY246296–KY246304).

Analizę zmienności i/lub zróżnicowania genetycznego przeprowadzono dla fragmentów DNA jądrowego (nrDNA) i chloroplastowego (cpDNA) (Tab. 2).

Tabela 2. Wyniki analiz sekwencjonowania regionów DNA jądrowego i chloroplastowego prób *Groenlandia densa* z Niemiec i Polski

Table 2. Results of sequencing analysis of nuclear and chloroplast DNA regions of *Groenlandia densa* samples from Germany and Poland

Lp. (No.)	Próba (Sample)	ITSA-ITS4	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL-atpB</i>	<i>rpS12-rpL20</i>
1	G-10-1	R1	H1	H2	H3
2	G-10-2	R1	H1	H2	H3
3	G-10-3	R1	H1	H2	H3
4	G-21-1	R1	H1	H2	H3
5	G-21-2	R1	H1	H2	H3
6	G-21-3	R1	H1	H2	H3
7	G-21-4	R2	H1	H2	H3
8	G-22-1	R1	H1	–	H3
9	G-22-2	R1	H1	H2	H3
10	G-22-3	R1	H1	H2	H3
11	G-22-4	R1	H1	H2	H3
12	G-22-5	R1	H1	H2	H3
13	G-23-1a	R1	H1	H2	H3
13	G-23-1b	R1	H1	H2	H3
14	G-23-2	R1	H1	H2	H3
15	G-23-3	R1	H1	H2	H3
16	G-23-4	R1	H1	H2	H3
17	G-23-5	R1	H1	H2	H3
18	G-31-1	R1	H1	–	H3
19	G-31-2	R1	H1	H2	H3
20	G-31-3	R1	H1	H2	H3
21	G-31-4	R1	H1	–	H3
22	G-32-1	R1	H1	H2	H3
23	G-32-2	R1	H1	H2	H3
24	G-32-3	R1	H1	H2	H3
25	G-32-4	R1	H1	H2	H3
26	G-32-5	R1	H1	H2	H3
27	G-50	R1	H1	–	H3

WYNIKI

Analiza jądrowego DNA (nr DNA)

Długość sekwencji regionu ITS1-ITS4 (nr DNA) wyniosła 675 pz. W badanej grupie osobników zidentyfikowano 1 mutację w pozycji 661 pz, reprezentującą substytucję jednonukleotydomową C=>G w próbie G21-4 (Tab. 2). W wyniku analizy zmienności genetycznej *Groenlandia densa* wykazano dwa rybotypy: R1 był odnotowany u 27 osobników, R2 reprezentował tylko jeden osobnik z populacji niemieckiej G21-4.

Zestawienie różnic pomiędzy rybotypami R1 i R2.

R1 – ... ----- C ---- ...

R2 – ... ----- G ---- ... w próbie G21-4.

Analiza chloroplastowego DNA (cpDNA)

Długość sekwencji w poszczególnych fragmentach wyniosła 352 pz w przypadku *psbA-trnH*, 650 pz dla *rpS12-rpL20* oraz 610 pz dla fragmentu *rbcL-atpB*. Pomimo testów (dotyczących różnych parametrów relacji PCR) dla prób zielnikowych, nie udało się zamplifikować fragmentu *atpB-rbcL*. W analizie zmienności genetycznej cpDNA, w przypadku każdego z fragmentów, nie zidentyfikowano mutacji. Osobniki z różnych populacji w odniesieniu do każdego z regionów: *psbA-trnH*, *rpS12-rpL20* i *rbcL-atpB* charakteryzował jeden haplotyp, odpowiednio: H1, H2 lub H3 (Tab. 2). Uzyskany wynik wskazuje na brak zmienności genetycznej i zróżnicowania w badanym materiale z Niemiec i Polski.

DYSKUSJA

Analiza zmienności genetycznej w badanym materiale *Groenlandia densa* wykazała podobieństwo genetyczne pomiędzy okazami ze stanowiska historycznego z Polski i z istniejących stanowisk z Niemiec. Tylko u jednego osobnika odnotowano substytucję jednonukleotydomową. Ten wyrównany poziom zmienności genetycznej *G. densa* charakteryzował materiał o dużym zróżnicowaniu morfologicznym i pochodzący z różnorodnych siedlisk. Brak zróżnicowania genetycznego pomiędzy okazami wskazuje, że w przypadku podejmowanych prac introdukcji *G. densa* na stanowiska w Polsce, potencjalny materiał źródłowy może być pobrany z objętych badaniami populacji z Niemiec. Należy jednak brać po uwagę, że identyczność genetyczna populacji wyjściowych w projektach introdukcji roślin wodnych uważana jest za czynnik zwiększający ryzyko niepowodzenia w dłuższej perspektywie czasowej, przy niestabilnych warunkach środowiskowych na obszarze docelowym (ORSENIGO i in. 2016).

W wielu artykułach przeglądowych, oceniających wyniki projektów rekultywacyjnych, zwraca się uwagę na przeważający w większości przypadków brak trwałych efektów introdukcji lub konieczność zastosowania kosztownych, długotrwałych działań utrzymaniowych po zakończeniu projektu (MASCHINSKI & DUQUESNEL 2006; MENGES 2008; DALRYMPLE i in. 2011). W związku z tym, autorzy prac zalecają dużą rozwagę przy podejmowaniu

decyzji o translokacji roślin, dopuszczając ją jedynie w określonych sytuacjach (MASCHINSKI & HASKINS 2012). W takich przypadkach ustalenie rzeczywistych przyczyn zaniku populacji przez weryfikację czynników wpływających na utrzymanie się gatunku w danym siedlisku, pozwala na realną ocenę możliwości uzyskania pozytywnych efektów introdukcji. W przypadku *Groenlandia densa* nie były prowadzone szczegółowe badania z zakresu biologii czy ekologii tego gatunku. Zebrane dane w ramach projektu na podstawie przeglądu literatury oraz obserwacji populacji tego gatunku w różnych częściach zasięgu, pozwoliły na wstępne zestawienie czynników i ocenę ich wpływu na występowanie *G. densa*. Spośród nich najczęściej wskazywanym czynnikiem jest dopływ wód podziemnych w postaci przesiąków przez osady denne lub dopływu wody ze źródeł (TRÉMOLIÉRES i in. 1993; WESTERMANN & WESTERMANN 1998; VANDERPOORTEN & KLEIN 1999; REYNOLDS i in. 2006; OT'ACHEL'OVÁ i in. 2007; LAYMAN'S REPORT 2008; NIEMEIJER i in. 2008; NPWS 2012). Nie ustalono jednak, czy dopływ wód podziemnych wpływa na konkretne i wspólne dla wszystkich stanowisk gatunku procesy ekofizjologiczne w ryzosferze lub w zwartych płatach zanurzonych w wodzie pędów roślin, czy też może dopływ wód podziemnych o względnie stabilnej temperaturze należy traktować jako element zapobiegający przegrzewaniu się wody czy zamarzaniu zbiornika. W przypadku populacji w austriackim Vorarlbergu, na obszarze charakteryzującym się wysoką roczną sumą opadów (powyżej 1600 mm), napływające zimą z północy chłodne masy powietrza są ogrzewane przez wody Jeziora Bodeńskiego, co zapobiega zamarzaniu wody i sprzyja utrzymaniu licznych stanowisk *G. densa* (Jäger, inf. ustna). W innych regionach, również o wysokiej rocznej sumie opadów atmosferycznych (np. w bawarskim potoku Lauterbach), występowanie stref nieciągłości geologicznej w podłożu powoduje, że lokalnie może dochodzić do podziemnego dopływu wody z rozpuszczonymi w niej substancjami (MENCIO i in. 2016). Wskutek tego rdestniczka utrzymuje się tylko w tych określonych miejscach. Innym wskazywanym czynnikiem sprzyjającym występowaniu *G. densa* jest wysoka zawartość jonów wapnia w wodzie (KHALANSKI i in. 1990; PRESTON 2003), co jednak może okazać się jedynie wskaźnikiem stabilnego zasilania zbiorników wodnych przez wody podziemne (np. krasowe), tym bardziej, że ALDASORO i in. (1996) wykazali, iż gatunek ten może występować w wodach o bardzo szerokim spektrum stężenia jonów wapniowych, wynoszącym od 10 do 250 mg · l⁻¹ i pH od 5 do 8.

Na podkreślenie zasługuje również fakt, że cechą większości zachowanych stanowisk *Groenlandia densa* w północnej Europie, jak i niektórych w Alpach, jest dopływ wód podziemnych zawierających znaczne stężenia zredukowanej formy żelaza Fe²⁺. Odporność gatunku na nadmiar żelaza może wynikać z niskiej intensywności akumulacji tego pierwiastka w tkankach rdestniczki, co zwiększa jej konkurencyjność w stosunku do innych gatunków roślin (DEMIREZEN & AKSOY 2006). W sytuacji konkurencji w środowisku wodnym prawdopodobnie większe znaczenie może mieć jednak symbioza rośliny z bakteriami i tworzenie lokalnych „mułowych ogniw elektrycznych”, których znaczenie zostało stwierdzone m.in. dla wegetatywnego rozmnażania *Potamogeton malaianus* (ZHOU i in. 2016). Natomiast zestawienie danych o warunkach troficznych wód, w których występuje rdestniczka pokazuje, że trudno jest jednoznacznie określić preferencje tego gatunku. Podczas gdy jedni autorzy zwracają uwagę na ograniczenie występowania rdestniczki do wód o niskiej trofii (DÖRR 1988; SCHÜTZ 1995; WESTERMANN & WESTERMANN 1998; SCHORER i in. 2000;

KOHLER & SCHNEIDER 2003; JIMÉNEZ & CAMARGO 2007), inni wskazują na preferencje umiarkowanej eutrofii (np. KOHLER i in. 1973; JÄGER 2014), zaś jeszcze inni oceniają, że *G. densa* preferuje stanowiska eutroficzne (HASLAM & WOLSELEY 1987; TRÈMOLIÈRES i in. 1993; PUJALON i in. 2008). Analizując rozmieszczenie *G. densa* z uwzględnieniem warunków troficznych, w jakich na danym terenie występuje, można wskazać tendencję, że stanowiska eutroficzne związane są z wilgotnym klimatem atlantyckim, a dalej na wschód Europy rdestniczka wyraźnie preferuje stanowiska oligotroficzne. Taką zmianę w preferencji siedliskowej, w zależności od położenia geograficznego jaką odnotowano u *G. densa*, podawano również dla innej zimozielonej rośliny wodnej *Luronium natans*. Gatunek ten na zachodzie Europy związany jest z żyznymi rzekami włosienicznikowymi (GREULICH & BORNETTE 2003), podczas gdy w Polsce nieliczne stanowiska *L. natans* są ograniczone do oligotroficznych jezior (SZMEJA 2004).

Obserwacje populacji *Groenlandia densa* w estuariach irlandzkich wykazały, że w tych siedliskach czynnikiem decydującym o zachowaniu gatunku jest występowanie naturalnych zaburzeń spowodowanych pływami oceanicznymi (NPWS 2012). W obszarach gdzie brak jest takich naturalnych perturbacji, prawdopodobnie podobną rolę spełniają prace związane z okresowym czyszczeniem kanałów i rowów. Powoduje to wprawdzie zniszczenie zielonych pędów rdestniczki, ale pozostające części jej rozłogów w osadach dennych w konsekwencji umożliwiają stałą obecność i utrzymanie się populacji gatunku w tych wodach (REYNOLDS i in. 2006). Wydaje się, że dzięki zabiegom czyszczenia, wykonywanym okresowo w wodach rozległej doliny dolnego Renu, rdestniczka zachowuje na tym terenie ciągłość występowania (NIEMEIJER i in. 2008). Natomiast w starorzeczach doliny środkowej Łaby, brak podobnych zabiegów mógł być przyczyną zaniku populacji *G. densa* (REMY 2011).

Groenlandia densa zarówno w wodach płynących, jak i stojących tworzy jednogatunkowe, wyraźnie odrębne płyty, które mogą pokryć cała powierzchnię zbiorników, jak np. w alpejskim jeziorze Landro (Dürensee) w Dolomitach (MORO i in. 2003). Jedynie wyjątkowo dochodzi do przenikania i łączenia się płatów *G. densa* z innymi gatunkami roślin. Może to wskazywać na konkurencyjne eliminowanie rdestniczki wraz z rozwojem sukcesyjnym biocenozy, wzrostem różnorodności oraz utrwalaniem i kolmatacją dna. Z tego wynika, że utrzymanie populacji rdestniczki może być łatwiejsze w sytuacjach braku interakcji z innymi gatunkami roślin, w czym pomocne mogą być zabiegi czyszczenia np. rowów. Dlatego czasami ekstremalne warunki środowiskowe, eliminujące konkurencję innych gatunków, umożliwiają występowanie rdestniczki. Potwierdzeniem tego może być fakt, że znane są współcześnie stanowiska z *G. densa* jako dominującym gatunkiem, zlokalizowane w zmodyfikowanych ekosystemach wodnych. Są to najczęściej stawy utworzone przez obudowanie i spiętrzenie źródlisk, jak np. w Borysławiu pod Lwowem na Ukrainie (BORSUKEVYCH 2010), w stawach parkowych w miejscowości Kladno w Czechach (STATUTORY CITY OF KLADNO) czy na obrzeżu gór Harzu w Niemczech (MEYER & HOCH 2010).

Jak wykazano, *Groenlandia densa* charakteryzuje się szerokim zakresem tolerancji w odniesieniu do różnych czynników środowiskowych. Zatem trudno ocenić, dlaczego gatunek ten jest rzadki, a w części zasięgu geograficznego wymierający lub już wymarły. Jednocześnie coraz więcej danych wskazuje, że czynnikiem przyspieszającym lokalne wymieranie *G. densa* mogą być współcześnie zachodzące zmiany klimatyczne. W tym

przypadku mniej istotny może być obserwowany postępujący wzrost średnich temperatur, a większe znacznie będzie odgrywać wzrost chaotyczności klimatu, przejawiający się długotrwałymi okresami suszy i nieregularnymi lokalnymi powodziąmi. Na to nakładają się zmiany hydrologiczne, bezpośrednio związane z gospodarowaniem wodą w skali zlewni, na które wpływają odwadnianie gruntów czy brak retencji zlewni (HATTON-ELLIS & GRIEVE 2003). Powoduje to okresowy spadek poziomu wód, wywołany okresami suszy i nadmierną eksploatacją zasobów wód podziemnych. To potwierdza, jak ważna jest rola wód podziemnych, pełniących funkcję buforową poprzez trwałe zasilanie wodą zbiorników wodnych, co zapobiega okresowemu wysychaniu koryt zbiorników.

Przedstawione dane o wymaganiach *Groenlandia densa* wskazują, że nie należy on do typowych gatunków rzadkich, których występowanie ograniczone jest do specyficznych typów siedlisk i związanych z wąskim zakresem parametrów środowiska. Natomiast zastosowanie może mieć tutaj koncepcja VANDERMEER'A (1982), w myśl której gatunki rzadkie, o nieregularnym występowaniu oraz cechujące się często kilkudziesięcioletnimi (lub dłuższymi) fluktuacjami wzrostów i redukcji liczebności populacji, określa się jako „gatunki chaotyczne”, do których można zaliczyć rdestniczkę. Dynamika zmian wielkości populacji w czasie może być np. interpretowana przez modele oparte na teorii chaosu, a nie przez bezpośrednie, liniowe zależności przyczynowo-skutkowe. Takie zmiany czy zaburzenia w siedliskach, choć rzadko analizowane, mogą być w rzeczywistości częste w naturalnych ekosystemach (HASTINGS & POWELL 1991). SHULENBURGER i in. (1999) zwracają uwagę, że nieoczekiwane zmiany, w tym również przypadkowe wymieranie gatunków w ekosystemach, mogą wystąpić jako konsekwencja przejściowego chaosu w systemie, nawet przy braku zewnętrznych zaburzeń czy jakichkolwiek definiowalnych przyczyn.

Przedstawione dane nie pozwalają na ustalenie jednoznacznych przyczyn wymierania badanego gatunku, a jedynie na wskazanie domniemanych czynników wpływających na występowanie rdestniczki w danym miejscu. Dlatego decyzje o introdukcji *Groenlandia densa* należy podejmować z dużą ostrożnością. Dodatkowo w okresie kilku ostatnich lat obserwuje się w regionie północnej Polski postępującą suszę, z roczną sumą opadów obniżoną do około 500 mm i obniżeniem poziomu zwierciadła wód podziemnych (SZPIKOWSKA 2016). W przypadku przywrócenia rdestniczki w dolinach pomorskich rzek w Polsce, utrzymanie tych stanowisk wymagałoby ciągłych prac związanych z pogłębianiem rowów, silnie drenujących dolinę. W konsekwencji zabiegi te mogą prowadzić do degradacji dolin, utraty ich funkcji ekosystemowych i cennych przyrodniczo siedlisk. Dlatego introdukcja *G. densa* na tereny północno-zachodniej Polski byłaby związana z dużym ryzykiem braku trwałych i pozytywnych efektów tych prac. Wydaje się, że w pierwszym rzędzie ważne jest zaplanowanie długofalowych działań, zmierzających do wzrostu zlewniowej retencji wody wraz z poprawą jej jakości. Pozytywne efekty takich prac mogłyby stanowić punkt wyjścia dla przywrócenia *G. densa* w wodach Pomorza.

Podziękowania. Praca powstała w ramach europejskiego projektu LIFE13 NAT/PL/000009 „Czynna ochrona siedlisk włosieniczników i udroźnienie korytarza ekologicznego zlewni rzeki Drawy w Polsce”. Autorzy dziękują Elżbiecie Hołubczat, Sylwii Jurzyk-Nordlów, Arturowi Furdynie i Piotrowi Walochowi za wsparcie, pomoc i udział w pracach terenowych. Badania częściowo finansowane ze środków statutowych Instytutu Botaniki im. W. Szafera PAN (E. Cieślak, J. Nowak).

LITERATURA

- AKHANI H. 2014. *Groenlandia densa* (L.) Fourr. – W: The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-2. www.iucnredlist.org (dostęp: 03.11.2016).
- ALDASORO J. J., AEDO C., MUÑOZ J., DE HOYOS C., VEGA J. C., NEGRO A. & MORENO G. 1996. A survey on Cantabrian mires (Spain). – *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **54**: 472–489.
- BLATTNER F. R. 1999. Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR. – *BioTechniques* **27**:1180–1186.
- BORSUKEYVICH L. M. 2010. *Groenlandia densa* (L.) Fourr. (*Potamogetonaceae*). – Predstavnik novogo dlâ flori Ukraïni rodu. – *Ukraïnskij Botaničnij Žurnal* **67**(1): 100–103.
- CHUNG J. D., LIN T. P., CHEN Y. L., CHENG Y. P. & HWANG S. Y. 2007. Phylogeographic study reveals the origin and evolutionary history of a *Rhododendron* species complex in Taiwan. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**(1): 14–24.
- CLEMENT M., POSADA D. & CRANDALL K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. – *Molecular Ecology* **9**: 1657–1660.
- DALRYMPLE S. E., STEWART G. B. & PULLIN A. S. 2011. Are re-introductions an effective way of mitigating against plant extinctions? Systematic Review. – CEE review 07-008 (SR32). Collaboration for Environmental Evidence: www.environmentalevidence.org/SR32.html.
- DEMIREZEN D. & AKSOY A. 2006. Common hydrophytes as bioindicators of iron and manganese pollutions. – *Ecological Indicators* **6**: 388–393.
- DÖRR E. 1988. Zur veränderten Verbreitung von *Groenlandia densa* und *Zannichellia palustris* im Allgäu und in dessen Vorland. – *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft zur Erforschung der heimischen Flora*. Munich **59**: 153–160.
- DUCKWORTH J., DAVIS R. & COSTLEY J. 2002. Junk food for plants: How nutrient pollution is threatening the UK's wild flora. s. 20. *Plantlife – The Wild-Plant Conservation Charity*, Summerfield Books, London, UK.
- EPREMÂN È. V. & KOBELÂN R. O. 2015. Sovremennoe sostoânie makrofitov reki Argiçi (Armeniâ). – W: A. G. LAPIROV, D. A. FILIPPOV & È. V. GARIN (red.), *Gidrobotanika 2015. Materialy VIII Vserossijskoj konferencii s meždunarodnym učastiem po vodnym makrofitam*, Borok, 16–20 oktâbrâ 2015, s. 105–108. Federal'noe agentstvo naučnyh organizacij Rossii, Rossijskaâ Akademiâ Nauk, Institut biologii vnutriennih vod im. I. D. Papanina, Filigran', Åroslavl'.
- FAGDATACENTER FOR BIODIVERSITET OG TERRESTRISK NATUR. *Groenlandia densa* (L.) Fourr. http://www2.dmu.dk/1_om_dmu/2_tvaer-funk/3_fdc_bio/projekter/redlist/data.asp?ID=9198&gruppeID=67 (dostęp: 03.11.2016).
- FLORAWEB. *Groenlandia densa* (L.) Fourr. <http://www.floraweb.de/pflanzenarten/artenhome.xsql?suchnr=2739> (dostęp: 03.11.2016).
- GARNIEL A. 1999. Schutzkonzept für gefährdete Wasserpflanzen der Fließgewässer und Gräben Schleswig-Holsteins. Kieler Institut für Landschaftsökologie, Kiel. http://www.kifl.de/pdf/C_Graeben.pdf.
- GHRABI-GAMMAR Z., DAUD-BOUATTOR A., FERCHICHI H., MOKHTAR GAMMA A., MULLER S. D., RHAZI L. & BEN SAAD-LIMAM S. 2009. Flore vasculaire rare, endémique et menacée des zones humides de Tunisie. – *La Revue d'écologie – la Terre et la Vie* **64**: 19–40.
- GREULICH S. & BORNETTE G. 2003. Being evergreen in an aquatic habitat with attenuated seasonal contrasts – a major competitive advantage? – *Plant Ecology* **167**(1): 9–18.
- HALL T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.

- HASLAM S. M. & WOLSELEY P. A. 1987. River plants of western Europe: the macrophytic vegetation of watercourses. s. 512. Cambridge University Press.
- HASTINGS A. & POWELL T. 1991. Chaos in a three-species food chain. – *Ecology* **72**(3): 896–903.
- HATTON-ELLIS T. W. & GRIEVE N. 2003. Ecology of watercourses characterised by *Ranunculon fluitantis* and *Callitriche-Batrachion* vegetation. Conserving Natura 2000 Rivers Ecology Series **11**. s. 65. English Nature, Peterborough.
- HERBICH J. (red.). 2004. Wody słodkie i torfowiska. Poradniki ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręcznik metodyczny. Tom **2**. s. 220. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- HOHLA M. 2012. Wasser- und Uferpflanzen am unteren Inn. – *ÖKO-L* **34**(1): 18–35.
- JASIEWICZ A. 1981. Wykaz gatunków rzadkich i zagrożonych flory polskiej. – *Fragmenta Floristica et Geobotanica* **27**(3): 401–414.
- JÄGER D. 2013. Rote Liste gefährdeter Wasserpflanzen Vorarlbergs. – Rote Listen Vorarlbergs Dornbirn (inatura) **6**: 1–200.
- JÄGER D. 2014. Die Wasserpflanzen des Grabensystems des Lauteracher Riedes, Vorarlberg / Österreich. inatura. – *Forschung online* **10**: 1–24.
- JIMÉNEZ A. & CAMARGO J. A. 2007. Ecological responses of epilithic diatoms and aquatic macrophytes to fish farm pollution in a Spanish river. – *Anales del Jardín botánico de Madrid* **64**(2): 213–219.
- KHALANSKI M., BONNET M. & GRÉGOIRE A. 1990. Evaluation quantitative de la biomasse végétale en Durance a l'aval du barrage de Serre-Ponçon. – *Hydroécologie Appliquée* **112**: 55–89.
- KHANJYAN N. 2004. Specially protected nature areas of Armenia. s. 54. Tigran Mets, Yerevan.
- KOHLER A. & SCHNEIDER S. 2003. Macrophytes as bioindicators. – *Archiv für Hydrobiologie Supplement* **147**. Large Rivers **14**(1/2): 17–31.
- KOHLER A., WONNEBERGER K. & ZELTNER G. H. 1973. Die Bedeutung chemischer und pflanzlicher „Verschmutzungsindikatoren“ im Fließgewässersystem Moosach (Münchener Ebene). – *Archiv für Hydrobiologie* **72**: 733–549.
- LAYMAN'S REPORT. 2008. Restoration and management of the lowland fen area Damvallei (LIFE03 NAT/B/000020). s. 10. Natuurpunt Beheer vzw, Mechelen, Belgium.
- LIETUVOS RAUDONOJI KNYGA. *Groenlandia densa* (L.) Fourr. <http://www.RaudonojiKnyga.lt> (dostęp: 03.11.2016).
- MASCHINSKI J. & DUQUESNEL J. 2006. Successful reintroductions of the endangered long-lived Sargent's cherry palm, *Pseudophoenix sargentii*, in the Florida Keys. – *Biological Conservation* **134**: 122–129.
- MASCHINSKI J. & HASKINS K. E. 2012. Plant reintroduction in a changing climate: promises and perils. s. 432. Island Press, Washington, D.C.
- MENCIÓ A., GUASCH H., SOLER D., CANELLES A., ZAMORANO M. & BRUSI D. 2016. Influence of regional hydrogeological systems at a local scale: Analyzing the coupled effects of hydrochemistry and biological activity in a Fe and CO₂ rich spring. – *Science of the Total Environment* **569–570**: 700–715.
- MENGES E. S. 2008. Restoration demography and genetics of plants: when is a translocation successful? – *Australian Journal of Botany* **56**: 187–196.
- MEYER S. & HOCH A. 2010. A new locality of *Groenlandia densa* (L.) Fourr. (*Potamogetonaceae*) in the surroundings of the southern Harz Mountains (Central Germany). – *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, Serie B* **111**: 185.
- MORO A., NIMIS P. L. & MARTELOS S. (red.). 2003. [continuously updated]: Il Cercapiante, published at <http://dbiodbs.units.it/carsocercapiante01/> Author of the image – Licence http://dbiodbs.units.it/carsocchiavi_pub26?spez=18252 (dostęp: 27.10.2016).

- NIEMEIJER I., BEEKERS B., KURSTJENS G., VAN BEERS P., CALLE P., LOUWEN M., LOTTERMAN K., BOLTEN M., BROUWER E., DAM N. & VAN BERGEN M. 2008. De Flora van de Gelderse Poort. Trends van indicatieve soorten tussen 1970 en 2008 en actuele ontwikkelingen van beschermde en bedreigde soorten (vanaf 2004). s. 124. Stichting Flora en Faunawerkgroep Gelderse Poort.
- NPWS 2012. Lower River Shannon SAC (site code 2165). Conservation objectives supporting document- Water courses of plain to montane levels with the *Ranunculion fluitantis* and *Callitriche-Batrachion* vegetation (habitat code 3260). Version 1. https://www.npws.ie/sites/default/files/publications/pdf/002165_Lower%20River%20Shannon%20SAC%20Water%20Courses%20Supporting%20Doc_V1.pdf
- ORSENIGO S., GENTILI R., SMOLDERS A. J. P., EFREMOV A., ROSSI G., ARDENGHI N. M. G., CITTERIO S. & ABELI T. 2016. Reintroduction of a dioecious aquatic macrophyte (*Stratiotes aloides* L.) regionally extinct in the wild. Interesting answers from genetics. – Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, doi: 10.1002/aqc.2626.
- OT' AHEL'OVÁ H., VALACHOVIČ M. & HRIVNÁK R. 2007. The impact of environmental factors on the distribution pattern of aquatic plants along the Danube River corridor (Slovakia). – Limnologica **37**: 290–302.
- POSADA D. & CRANDALL K. A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. – Trends Ecology **16**:37–45.
- PRESTON C. D. 2003. Pondweeds of Great Britain and Ireland. s. 350. BSBI Handbook No. 8. Botanical Society of the British Isles, London.
- PUCHALSKI W. 2004. Nizinne i podgórskie rzeki ze zbiorowiskami włosieniczników. – W: J. HERBICH (red.), Poradniki ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręcznik metodyczny. Tom 2. Wody słodkie i torfowiska, s. 96–108. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- PUJALON S., PIOLA F. & BORNETTE G. 2008. Abiotic stresses increase plant regeneration ability. – Evolutionary Ecology **22**(4): 493–506.
- REMY D. 2011. Altgewässer und ihre Bedeutung für die Wasservegetation. – Tuexenia **31**: 73–85.
- REYNOLDS S., CONAGHAN J. & FULLER J. 2006. A survey of rare and scarce vascular plants in County Limerick. – Unpublished report to the National Parks and Wildlife Service.
- RONIKIER M., COSTA A., FUERTES AGUILAR J., NIETO FELINER G., KÜPFER P. & MIREK Z. 2008. Phylogeography of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (*Ranunculaceae*): chloroplast DNA reveals two evolutionary lineages across central Europe and Scandinavia. – Journal of Biogeography **35**: 1650–1664.
- SABOVLJEVIĆ M. & FRAHM J. P. 2011. Genetic diversity of the relict moss *Rhytidium rugosum* (*Hypnales*) in Europe inferred from the ITS region (nrDNA). – Biologia Section Botany **66**(1): 42–49.
- SCHORER A., SCHNEIDER S. & MELZER A. 2000. The importance of submerged macrophytes as indicators for the nutrient concentration in a small stream (Rotbach, Bavaria). – Limnologica **30**: 351–358.
- SCHÜTZ W. 1995. Vegetation of running waters in Southwestern Germany – pristine conditions and human impact. – Acta Botanica Gallica **142**(6): 571–584.
- SHAW J., LICKEY E. B., BECK J. T., FARMER S. B., LIU W., MILLER J., SIRIPUN K. C., WINDER CH. T., SCHILLING E. E. & SMALL R. L. 2005. The tortoise and the hare ii: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. – American Journal of Botany **92**(1): 142–166.
- SHAW J., LICKEY E. B., SCHILLING E. E. & SMALL R. L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. – American Journal of Botany **94**(3): 275–288.
- SHULENBURGER L., LAI Y. C., YALÇINKAYA T. & HOLT R. D. 1999. Controlling transient chaos to prevent species extinction. – Physics Letters A **260**: 156–161.

- STATUTORY CITY OF KLADNO. http://www.mestokladno.cz/EN/vismo/dokumenty2.asp?id_org=100977&i-d=1030&p1=1012 (dostęp: 03.11.2016).
- SWEDISH SPECIES INFORMATION CENTRE PUBLISHED. *Groenlandia densa* (L.) Fourr. <http://www.slu.se/en/Collaborative-Centres-and-Projects/artdatabanken/> (dostęp: 03.11.2016).
- SZMEJA J. 2004. *Luronium natans* (L.) Raf. – W: B. SUDNIK-WÓJCİKOWSKA & H. WERBLAN-JAKUBIEC (red.), Gatunki roślin. Poradnik ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręcznik metodyczny. Tom. 9, s. 155–159. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- SZPIKOWSKA G. 2016. Wody podziemne. – W: A. KOSTRZEWSKI & J. SZPIKOWSKI (red.), Raport z realizacji programu badawczo-pomiarowego ZMŚP w SB Storkowo w 2015 roku, s. 81–99. Mskr., Storkowo.
- TRÈMOLIÈRES M., EGLIN I., ROECK U. & CARBIENER R. 1993. The exchange process between river and groundwater on the Central Alsace floodplain (Eastern France). I. The case of the canalised river Rhine. – *Hydrobiologia* **254**: 133–148.
- VAN DE WEYER K. 1989. *Groenlandia densa* (L.) Fourr. in der Wassermarsch. – *Floristische Rundbriefe* **23**: 8–12.
- VAN DE WEYER K. 1992. Die Verbreitung und Vergesellschaftung von *Groenlandia densa* (L.) Fourr. im Niederrheinischen Tiefland. – *Natur am Niederrhein* (Krefeld) N. F. **7**: 6–12.
- VANDERMEER J. 1982. To be rare is to be chaotic. – *Ecology* **63**: 1167–1168.
- VANDERPOORTEN A. & KLEIN J.P. 1999. A comparative study of the hydrophyte flora from the Alpine Rhine to the Middle Rhine. Application to the conservation of the Upper Rhine aquatic ecosystems. – *Biological Conservation* **87**: 163–172.
- WESTÈRMANN K. & WESTÈRMANN S. 1998. Spring waters and their vegetation in the South Baden Upper Rhine lowlands. – *Naturschutz südlichen Oberrhein* **2**: 1–93.
- WHITE T. J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – W: M. A. INNIS, D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY & T. J. WHITE (red.), PCR Protocols: a guide to methods and applications, s. 315–322. Academic Press, New York, USA.
- YENIYURT C. & HEMMAMI M. 2011. Ramsar sites of Turkey. s. 110. Doğa Derneği, Ankara.
- YOUSEFI M. & TORANJ S. 2015. A preliminary checklist of vascular aquatic plants of Iran. – *Research Journal of Recent Sciences* **4**: 1–8.
- ZARZYCKI K. & SZELĄG Z. 2006. Czerwona lista roślin naczyniowych w Polsce. – W: Z. MIREK, K. ZARZYCKI, W. WOJEWODA & Z. SZELĄG (red.), Czerwona lista roślin i grzybów Polski, s. 9–20. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- ZARZYCKI K., WOJEWODA W. & HEINRICH Z. (red.). 1986. Lista roślin wymierających i zagrożonych w Polsce. Polska Akademia Nauk, Komitet Ochrony Przyrody i Instytut Botaniki, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- ZHOU Y.-L., WU H.-F., YAN Z.-S., CAI H.-Y. & JIANG H.-L. 2016. The enhanced survival of submerged macrophyte *Potamogeton malaianus* by sediment microbial fuel cells. – *Ecological Engineering* **87**: 254–262.
- ŻUKOWSKI W. 2001. *Groenlandia densa* (L.) Fourr., Rdestnica gęsta. – W: R. KAŻMIERCZAKOWA & K. ZARZYCKI (red.), Polska Czerwona Księga Roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe, s. 407–408. Instytut Botaniki im. W. Szafera, Instytut Ochrony Przyrody, Polska Akademia Nauk, Kraków.
- ŻUKOWSKI W. 2014. *Groenlandia densa* (L.) Fourr., Rdestniczka gęsta (rdestnica gęsta, grenlandia gęsta). – W: R. KAŻMIERCZAKOWA & K. ZARZYCKI (red.), Polska Czerwona Księga Roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe, s. 574–575. Instytut Ochrony Przyrody, Polska Akademia Nauk, Kraków.

SUMMARY

When facing a regional species extinction, reintroduction is often considered an appropriate measure to counteract the decline in biodiversity. Numerous data indicate that *Groenlandia densa* has become extinct in many locations, particularly in the north-eastern part of its former range, including the Baltic drainage area. In Germany a few relict populations are still extant in the lower floodplains of the Weser and Rhine rivers, but in eastern Germany it is already considered extinct. No such strong decline of local populations has been reported in alpine and a part of subalpine regions of Austria and Germany.

During the 20th century this plant has become very rare in Poland, eventually restricted to a few scattered locations in northern regions. Since 1987, no occurrence of *Groenlandia densa* have been noted there, so recently the Regional Directorate for Environmental Protection in Szczecin has been considering introduction of this species into Pomeranian waters. A study for such a measure included a review of the literature and other available data on its actual occurrence, as well as an examination of the environmental factors reported to affect this species in Europe. Such data served as the basis for an attempt to find the causes of its rapid regional decline.

In Germany as a whole, the remained populations of *Groenlandia densa* occur in a wide range of habitats, and the plant's morphology also varies between sites; in view of these differences, the populations of *G. densa* from the German sites were genetically analysed to determine their level of variability and/or genetic diversity and to assess the feasibility of introducing the species to Poland (Tab. 1). Sequencing analysis of ITS (nrDNA) and chloroplast regions (cpDNA) was employed (Tab. 2). Samples of extant populations from some ditches and a pond in north-west Germany were tested, along with one specimen from a historical Polish site. The results showed high genetic similarity between all samples studied: only one individual had a single-nucleotide substitution. Thus, each of the studied German populations is potential source material of *G. densa* for any possible introduction to Poland.

However, genetic similarity should not be the deciding argument for reintroduction. A review of the available literature and observational data indicate multiple ecological and biogeographical factors which may affect the occurrence of this plant in its specific sites. The different localities of the species vary greatly in the properties of the water, with high or low trophic status, stagnant or flowing water and different levels of calcium concentrations or supply of reduced iron. The factor most often considered important is undisturbed seepage of groundwater to the waterbodies; also, some level of environmental perturbation, both natural (floods, tides) and human-caused (cleaning of ditches), may stimulate colonisation and growth of *Groenlandia densa*. Factors related to the decline of the species include recent wide-ranging changes in climate and hydrology, with prolonged periods of drought and irregular flooding, and the failure to adapt catchment-scale water management practices to the new dynamic patterns, all of which impairs the exchange between groundwater and surface water.

In the context of the apparently chaotic character of the species' dynamics, however, no single factor might be directly responsible for the extinction process in the northern part of its former range. In view of the complexity of biotic interactions in natural ecosystems, no current efforts to introduce *G. densa* are advised, as long-term establishment of its population is not certain. On the other hand, chaotic species dynamics proceed in long-term phases, and a successive expansion phase might be initiated at some future time. Therefore it would be advisable to maintain a suitable environment for any future assisted colonisation. A prerequisite for any future restoration of this plant in Pomerania is a large-scale effort to increase the water retention in catchments and improve groundwater quality.

Przyjęto do druku: 09.11.2016 r.