

UNIwersYTET KAZIMIERZA WIELKIEGO
INSTYTUT BIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ
KATEDRA GENETYKI

Jarosław Burczyk

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut
Biologii Eksperymentalnej, Katedra Genetyki, ul Chodkiewicza 30, 85-064
Bydgoszcz, e-mail: burczyk@ukw.edu.pl

Sprawozdanie końcowe z realizacji zadania zleconego:

Ochrona czynna modrzewia polskiego *Larix decidua* ssp. *polonica* na Chełmowej
Górze w Świętokrzyskim Parku Narodowym.

Etap II – ocena zmienności genetycznej odnowienia i dyspersji genów w populacji
modrzewia polskiego na Chełmowej Górze

Zleceniodawca: Świętokrzyski Park Narodowy z siedzibą w Bodzentynie

Bydgoszcz 12.11.2018

Spis treści

1. WSTĘP	3
2. METODY	5
2.1. Opis powierzchni badawczych.	5
2.2. Zbiór materiału	6
2.3. Analizy laboratoryjne	6
2.4. Analizy statystyczne	8
3. WYNIKI	9
3.1. Zmienność genetyczna poszczególnych subpopulacji	9
3.2. Zróżnicowanie genetyczne między subpopulacjami	10
3.3. Przestrzenna struktura genetyczna populacji	10
3.4. Efektywna wielkość populacji	11
3.5. Analizy rodzicielstwa	12
3.5.1. Siewki powstałe z naturalnego odnowienia.....	12
3.5.2. Nasiona pozyskane z wybranych drzew matecznych	17
4. WNIOSKI KOŃCOWE	22
Literatura	24

1. WSTĘP

Modrzew polski (*Larix decidua* subsp. *polonica* (Racib. Domin) będący, jak się dzisiaj uważa, podgatunkiem modrzewia europejskiego, jest jednym z cenniejszych drzew lasotwórczych w Polsce. Leśnicy z rejonu Gór Świętokrzyskich od dawna znali i doceniali wartości uprawowe modrzewia rodzimego pochodzenia, wprowadzając go do upraw już na początku XIX wieku (Bałut 1962, Barański 1970). Jednak na jego odrębność morfologiczną zwrócono uwagę stosunkowo późno, bo dopiero na przełomie XIX i XX wieku (Raciborski 1890).

Już w 1920 roku na Chełmowej Górze utworzono rezerwat w celu ochrony naturalnego stanowiska modrzewia polskiego. Obecnie ta unikalna populacja modrzewia zagrożona jest stopniowym procesem wymierania. Stare drzewa stopniowo wypadają, jednocześnie brak jest naturalnego odnowienia. Pewnym problemem jest występowanie w pobliskich lasach sztucznych nasadzeń modrzewiem nieznanego pochodzenia, prawdopodobnie spoza Góry Chełmowej. W najbliższym czasie planuje się, w odpowiednich ku temu miejscach, podjąć działania stymulujące powstanie naturalnego odnowienia, a w dalszej perspektywie służące zabezpieczeniu i utrzymaniu powstałych odnowień. Jednak, aby można było racjonalnie zarządzać pulą genową i monitorować poziom zmienności i strukturę genetyczną naturalnych odnowień niezbędne są informacje dotyczące poziomu zmienności i struktury genetycznej populacji modrzewia rosnących na Chełmowej Górze.

Badania takie przeprowadzono w roku ubiegłym na zlecenie Świętokrzyskiego Parku Narodowego (Burczyk i in. 2017; Litkowiec i in. 2018). Badania wykazały, że ponad 150-letnie populacje rosnące w centralnej części rezerwatu posiadają znaczną zmienność genetyczną, jednak są stosunkowo jednorodne prezentując pulę genową charakterystyczną dla populacji modrzewia występujących w Polsce Centralnej. Badania wykazały istnienie przestrzennej struktury genetycznej w tych populacjach potwierdzając tym samym ich naturalny charakter pochodzenia. Natomiast trzecia z badanych populacji, młodsza wiekowo, wykazywała symptomy nienaturalnego pochodzenia, znaczną odmienność genetyczną oraz dużą niejednorodność, co potwierdziło wcześniejsze przypuszczenia oparte na analizie struktury wiekowej i charakteru fenotypowego tej populacji.

Każde działanie podjęte w celu ochrony puli genowych zagrożonych gatunków powinno być poprzedzone dokładną analizą genetyczną, której wyniki pozwolą nie tylko ocenić poziom i rozkład zmienności genetycznej, ale również mechanizmy decydujące o zmienności genetycznej populacji. Kompleksowa wiedza z zakresu ekologii i genetyki populacyjnej stwarza ogromne możliwości dla prawidłowej odbudowy populacji cennych, czy wręcz zagrożonych gatunków. Wiedza na temat zmienności genetycznej i mechanizmach ją kształtujących ma duże znaczenie w tworzeniu programów ochrony gatunków zagrożonych oraz opracowaniu optymalnej strategii hodowli gatunków o znaczeniu gospodarczym, pozwalając jednocześnie chronić pulę genową i uszlachetniać odmiany, a tym samym zwiększać zysk ekonomiczny, związany z ich hodowlą.

Ochrona i wzbogacanie istniejącej w lasach różnorodności genetycznej jest jednym z celów strategicznych w „Programie zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew w Polsce na lata 2011 – 2035”. Jest ona również troską instytucji pełniących pieczę nad obszarami objętymi ochroną. Z uwagi na odrębność genetyczną populacji modrzewia polskiego na Chełmowej Górze stwierdzoną w wyniku przeprowadzonych badań, powstaje pytanie, czy zmienność genetyczna reprezentowana przez badane populacje może być zachowana w długim horyzoncie czasowym i czy nie ulegnie ona deprecjacji na skutek oddziaływania innych otaczających populacji (przepływ genów z innych populacji za pomocą dyspersji nasion i pyłku), co mogłoby prowadzić do utraty unikalnego charakteru badanych populacji. Informacje te są niezbędne w celu podjęcia stosownych działań zmierzających do ochrony puli genowej modrzewia na Chełmowej Górze.

Cele badań

Celem badań była ocena przebiegu procesów reprodukcyjnych zachodzących w populacjach modrzewia polskiego w rezerwacie Chełmowa Góra oraz próba odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu badane populacje znajdują się pod wpływem przepływu genów od okolicznych populacji. Szczegółowe cele obejmowały:

1. Analizę zmienności genetycznej populacji potomnych (siewki powstałe w wyniku naturalnego obsiewu nasion oraz zarodki nasion pozyskanych z wybranych drzew).
2. Ocenę poziomu samozapylenia, poziomu imigracji pyłku spoza badanej populacji oraz krzywych dyspersji pyłku w ramach lokalnej populacji.

3. Określenie udziału osobników lokalnej populacji w zapyłaniu badanych drzew matecznych na podstawie znajomości genotypów zarodków nasion oraz genotypów i lokalizacji potencjalnych drzew rodzicielskich.
4. Ocenę poziomu imigracji nasion spoza lokalnej populacji, krzywej dyspersji nasion w ramach lokalnej populacji.
5. Określenie udziału poszczególnych osobników w tworzeniu lokalnej populacji na podstawie genotypów i danych lokalizacyjnych siewek powstałych z naturalnego odnowienia oraz genotypów i lokalizacji drzew dorosłych.
6. Określenie w jakim stopniu badane populacje mogą być pod wpływem oddziaływania otaczających populacji, na skutek przepływu genów poprzez nasiona i pyłek.

2. METODY

2.1. Opis powierzchni badawczych.

Subpopulacja M1 została wybrana w wydzieleniach h i i oddziału 1A. Występuje tu modrzew w wieku 190 lat w udziale 30 - 40%, w zmieszaniu z dębem i bukiem. Subpopulację M2 wyznaczono w wydzieleniu c oddziału 3A. Udział modrzewia w tym wydzieleniu jest podobny (40%). Jednak jest to drzewostan nieco młodszy, ok. 170-letni z 60% udziałem buka. Te dwie subpopulacje zostały wybrane w miejscach, w których planuje się w najbliższych latach zainicjować odnowienie naturalne modrzewia (Tabela 1). W ramach każdej z subpopulacji w roku 2017 wyznaczono po 126 osobników, dla których określono genotypy w oparciu o 11 loci mikrosatelitarne (Burczyk i in. 2017).

Tabela 1. Wykaz badanych populacji oraz liczba osobników zbadana w 2017 roku.

Populacja	Liczebność	Oddział	Powierzchnia	zagęszczenie	Średnia wysokość	Średni Obwód
Populacja M1 (dorośle)	126	A1-h, A1-i	103930 m ²	0,0012	29,50 m	218,29 cm
Populacja M2 (dorośle)	126	A3-c	77783 m ²	0,0016	33,43 m	235,99 cm

2.2. Zbiór materiału

Materiał do badań w postaci igieł osobników młodocianych (siewki) oraz szyszek został pozyskany przez zleceniodawcę i dostarczony do Katedry Genetyki zgodnie z umową, do dnia 10.09.2018. Wraz z materiałem przekazano informacje o drzewach, z których pozyskano szyszki, oraz dokumentację zbioru materiału z osobników młodocianych. Ponadto dostarczono dane geodezyjne określające współrzędne wszystkich osobników młodocianych (siewki), z których pozyskano materiał (plik shape).

Materiał badawczy stanowiły łącznie 81 osobników młodocianych z populacji M1. W ramach badanej populacji nie udało się pozyskać materiału z większej liczby osobników młodocianych. W populacji M2 nie odnotowano osobników młodocianych, z których możliwe było pobranie materiału do badań.

W każdej subpopulacji pozyskano szyszki z 10 drzew. Następnie w laboratorium Katedry Genetyki UKW dokonano wyłuszczenia nasion. Nasiona poddano kiełkowaniu, a następnie dla każdego drzewa wybrano po 30 siewek, z których wyizolowano DNA. Łącznie wyizolowano DNA z 600 siewek pochodzących ze skiełkowanych nasion.

2.3. Analizy laboratoryjne

Do izolacji DNA z dostarczonego materiału (igły modrzewia) wykorzystano zestawy odczynników firmy Eurx. Następnie sprawdzono wartość stężenia DNA w każdej próbce i wykonano rozcieńczenia matrycowego DNA do około 10 ng/μl dla potrzeby reakcji PCR (kalkulator DNA Bio-Photometer marki Eppendorf). Reakcja PCR (dwa różne multipleksy) została przeprowadzona z zastosowaniem termocyklera MJ Research PTC 200 i zestawu odczynników Qiagen Multiplex PCR firmy Qiagen. Analizę otrzymanych produktów przeprowadzono na analizatorze genetycznym Applied Biosystems 3130xl. Interpretację wyników wykonano z użyciem programów komputerowych GeneScan 3.7 oraz Genotyper 3.7, dostarczonych przez producenta analizatora genetycznego. Charakterystykę loci mikrosatelitarnych wytypowanych do badań, warunki przebiegu reakcji PCR oraz składy mieszanin reakcyjnych dla badanego gatunku przedstawiono poniżej (Tabele 2-5).

Tabela 2. Charakterystyka loci mikrosatelitarnych wybranych do analiz.

Locus	Sekwencja primerów (5' – 3')	Znacznik fluoresc.	Źródło
<i>LD50</i>	F: GAAGGCGACTTTACATGCC R: TCCATCTTTATGTCTCTTCCATGC	PET	Wagner 2012
<i>LD56</i>	F: AGCCATCGTGGTTCTTCTTTG R: CTTGTAAGTGTGCACCCACC	PET	Wagner 2012
<i>bcLK189</i>	F: ACCATACGCATACCCAATAGA R: AGTTTTCCTTTCCCACACAAT	NED	Isoda & Watanabe 2006
<i>bcLK211</i>	F: CCATTCTCCATAGGTTTCATTG R: ATGCTCCTTACTAAGTCAGATACAC	NED	Isoda & Watanabe 2006
<i>LD31</i>	F: TTGAACTAGGGAGATCCGGC R: AATAAAATAGCATTCCATGTGTAGC	FAM	Wagner 2012
<i>LD45</i>	F: TGTGGGAGGTATAGCTTGGC R: AGTAGGATGGAATGATGGAAACAC	FAM	Wagner 2012
<i>bcLK229</i>	F: ATGCCCAAAAACGAAAAAGT R: TTTGCACTGCCAGATTGAGA	PET	Isoda & Watanabe 2006
<i>bcLK228</i>	F: CCCTAACCCCTAGAATCCAATAA R: GAGGAAGGCGACAAGTCATT	PET	Isoda & Watanabe 2006
<i>LD101</i>	F: ACACCAAGGACTCTCTGACTAC R: GGTGATTCCAGAAGCAGGTG	VIC	Wagner 2012
<i>bcLK263</i>	F: CGATTGGTATAGTGGTCATTGT R: CCATCATACCTTCTTGAAGAG	NED	Isoda & Watanabe 2006
<i>LD 42</i>	F: TCGTATGCATTGTCCAAATTTCC R: TCCAAGTGAGGTCACACGAG	FAM	Wagner 2012

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej Multipleks1.

	Ilość w μ l	Stężenie wyjściowe	Stężenie w reakcji
MMM	5	2x	1x
BSA	0,5	10 mg/ml	0,5 mg/ml
<i>LD 50</i>	0,2	5 μ M	100 nM
<i>LD 56</i>	0,2	5 μ M	100 nM
<i>bcLK189</i>	0,25	5 μ M	125 nM
<i>bcLK211</i>	0,4	5 μ M	200 nM
<i>LD 31</i>	0,2	5 μ M	100 nM
<i>LD 45</i>	0,2	5 μ M	100 nM
DNA	1	10 ng/ μ l	10 ng/ μ l
H ₂ O	0,6	-	-

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej Multipleks2.

	Ilość w μ l	Stężenie wyjściowe	Stężenie w reakcji
MMM	5	2x	1x
BSA	0,5	10 mg/ml	0,5 mg/ml
<i>bcLK 229</i>	0,25	5 μ M	125 nM
<i>bcLK 228</i>	0,25	5 μ M	125 nM
<i>bcLK 263</i>	0,3	5 μ M	150 nM
<i>LD 101</i>	0,3	5 μ M	150 nM
<i>LD 42</i>	0,25	5 μ M	125 nM
DNA	1	10 ng/ μ l	10 ng/ μ l
H ₂ O	0,8	-	-

Tabela 5. Warunki przebiegu reakcji PCR

1	95°C	15 min
2	94°C	30 s
3	56°C	1 min
4	72°C	1 min
5	Go to step 2	x 32
6	60°C	30 min
7	4°C	forever

2.4. Analizy statystyczne

Poziom zmienności genetycznej badanych subpopulacji modrzewia określono w oparciu o: średnią (A) liczbę alleli w locus oraz heterozygotyczności oczekiwaną (H_e) i obserwowaną (H_o) za pomocą programu INEST v.2.0 (Chybicki i Burczyk 2009). Za pomocą tego programu dokonano również oceny częstości alleli zerowych (*null*) oraz poziomu wsobności w sposób tradycyjny (F_{is}) oraz uwzględniając przy tym możliwość występowania częstości alleli zerowych (F_{isnull}).

W celu oszacowania stopnia zróżnicowania genetycznego między populacjami oszacowano parametry F_{st} oraz R_{st} za pomocą programu SPAGEDI (Hardy i Vekemans 2002). Ocenę efektywnej wielkości populacji przeprowadzono w oparciu o model nierównowagi gametycznej, wykorzystując oprogramowanie NeEstimator v.2.0 (Do i in. 2014).

Na podstawie znajomości genotypów zarodków nasion oraz genotypów i lokalizacji potencjalnych drzew rodzicielskich oceniono poziom samozapylenia, poziom imigracji pyłku spoza badanej populacji oraz krzywe dyspersji pyłku w ramach lokalnej populacji. Określono również udział osobników lokalnej populacji w zapyłaniu badanych drzew matecznych. Na podstawie genotypów i danych lokalizacyjnych siewek powstałych z naturalnego odnowienia oraz genotypów i lokalizacji drzew dorosłych, oceniono również: poziom imigracji nasion spoza lokalnej populacji, krzywą dyspersji nasion w ramach lokalnej populacji, udział poszczególnych osobników w tworzeniu lokalnej populacji. Analizy przeprowadzono w oparciu o tzw. model kojarzenia w sąsiedztwie (Burczyk i in. 2006), z wykorzystaniem programu komputerowego $NM\pi$ (Chybicki 2018).

3. WYNIKI

3.1. Zmienność genetyczna poszczególnych subpopulacji

Dwie subpopulacje osobników rodzicielskich, jak wykazano poprzednio, miały podobny poziom zmienności. Średnia liczba alleli wyniosła odpowiednio: M1 – 9,5 i M2 – 9,6. Tym niemniej populacja M2 wykazywała nieco wyższy poziom heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej niż populacja M1. Średnia częstość alleli *null* była podobna dla wszystkich badanych populacji, ale najniższa w populacji siewek.

Populacje potomne były zróżnicowane pod względem średniej liczby alleli. Najniższą wartość odnotowano w populacji siewek S1 (8,73), natomiast zdecydowanie najwyższą w populacji nasion pozyskanych z osobników dorosłych z populacji M2. Wysokie wartości liczby alleli w populacjach potomnych (nasiona), wyraźnie wyższe niż w populacjach osobników rodzicielskich mogą świadczyć o istnieniu dopływu genów za pośrednictwem pyłku.

Populacje wykazywały nieistotny poziom wsobności ocenionej za pomocą metody INEst uwzględniającej możliwość występowania alleli zerowych, za wyjątkiem puli nasion wywodzących się z populacji M1, gdzie odnotowano wsobność na poziomie 0,023, i była to wartość istotna statystycznie.

Tabela 6. Parametry opisujące poziom zmienności genetycznej w badanych subpopulacjach modrzewia polskiego (N -liczba analizowanych osobników; A -średnia liczba alleli w locus; H_o - heterozygotyczność obserwowana; H_e - heterozygotyczność oczekiwana; F_{is} - współczynnik wsobności; $F_{is,null}$ - współczynnik wsobności po uwzględnieniu częstości alleli zerowych; $Freq.Null$ - średnia częstość alleli zerowych. Wyniki dla subpopulacji M1 i M2 pochodzą z raportu z 2017 roku (Burczyk i in. 2017).

Populacja	N	A	H_o	H_e	F_{is}	$F_{is,null}$	$Freq. Null$
M1	126	9,5	0,672	0,691	0,031	0,005	0,030
M2	126	9,6	0,709	0,722	0,021	0,005	0,030
S1	81	8,73	0,675	0,701	0,040	0,007	0,023
N1	300	10,82	0,663	0,703	0,062	0,023	0,028
N2	300	11,73	0,676	0,713	0,063	0,008	0,030

3.2. Zróżnicowanie genetyczne między subpopulacjami

Powyższe wyniki znajdują odzwierciedlenie w wartościach współczynnika genetycznego zróżnicowania pomiędzy subpopulacjami (F_{st}) (Tabela 10). Średnio, współczynnik zróżnicowania genetycznego pomiędzy badanymi subpopulacjami modrzewia wyniósł 0,0201 i był statystycznie istotny ($p=0,001$). Genetyczne zróżnicowanie ($F_{st}=0,0153$) stwierdzono pomiędzy subpopulacjami M1 i M2. Natomiast nie odnotowano istotnego zróżnicowania między populacją M1 i S1, to znaczy między populacją osobników dorosłych a populacją siewek występujących na tym samym obszarze. Między populacją osobników dorosłych, a populacją nasion uzyskanych w danej populacji odnotowano niskie, aczkolwiek istotne zróżnicowanie w populacji M1/N1, dla populacji M2/N2 brak było istotnego zróżnicowania genetycznego. Oceny zróżnicowania genetycznego oszacowane za pomocą parametru R_{st} wykazały podobne trendy, jak dla F_{st} (Tabela 7).

Tabela 7. Współczynniki genetycznego zróżnicowania pomiędzy badanymi subpopulacjami modrzewia polskiego (F_{st} - powyżej diagonalnej; R_{st} - poniżej diagonalnej). (pogrubioną czcionką zaznaczono wartości istotne statystycznie; $p<0,05$).

Populacja	M1	M2	S1	N1	N2
M1	-	0,0153	0,0038	0,0072	0,0285
M2	0,0601	-	0,0130	0,0212	0,0030
S1	-0,0029	0,0896	-	0,0052	0,0272
N1	0,0056	0,0330	-0,0011	-	0,0334
N2	0,0149	-0,0023	0,0190	0,0275	-

3.3. Przestrzenna struktura genetyczna populacji

Analizy przestrzennej struktury genetycznej przeprowadzone w ubiegłym roku osobno dla każdej z badanych populacji wykazały, że obie subpopulacje osobników dorosłych (M1 i M2) wykazują istotną statystycznie przestrzenną strukturę genetyczną (istotne statystycznie wartości parametrów b_{log} ; Tabela 8). Oznacza to, że istnieje tendencja wzrostu stopnia pokrewieństwa między osobnikami wraz ze zmniejszaniem się odległości między nimi. Wyniki dla obu subpopulacji dorosłych były bardzo podobne (brak istotnych różnic między

populacjami). Jednak analizy przeprowadzone dla populacji siewek **S1** nie wykazały istnienia przestrzennej struktury genetycznej tej grupy osobników, bowiem parametr b_{\log} był w tym wypadku nieistotnie różny od zera. Ponadto, prześledzenie korelogramu dla subpopulacji młodocianej nie wykazuje istnienia współczynników F_{ij} , które przyjmowałyby wartości istotnie większe od 0 w całym badanym zakresie dystansów. Brak istotnej przestrzennej struktury genetycznej w wypadku siewek może wynikać z niewielkiej liczebności populacji siewek, lub może świadczyć o stosunkowo intensywnej dyspersji nasion w badanej populacji.

Tabela 8. Parametry przestrzennej struktury genetycznej dla badanych subpopulacji modrzewia (Sp – intensywność struktury przestrzennej; b_{\log} – współczynnik kierunkowy linii regresji pomiędzy współczynnikiem pokrewieństwa a logarytmem odległości między osobnikami; F_1 – średnia wartość współczynnika pokrewieństwa w pierwszej klasie dystansu; Nb – efektywna liczebność sąsiedztwa; σ - średnia odległość dyspersji genów). Wyniki dla subpopulacji M1 i M2 pochodzą z raportu z 2017 roku (Burczyk i in. 2017).

Subpopulacja	Liczebność	Sp	b_{\log} (SE)	F_1
M1 (dorosłe)	126	0,0086	-0,0083 (0,0014)	0,0335
M2 (dorosłe)	126	0,0108	-0,0105 (0,0024)	0,0314
S1 (siewki)	81	0,0008	-0,0007 (0,0009)	-0,0001

3.4. Efektywna wielkość populacji

Dla badanych subpopulacji oszacowano stosunkowo duże wartości efektywnej wielkości populacji (Tabela 9). Różnice między subpopulacjami osobników dorosłych nie były istotne statystycznie. Oznacza to, że populacje te powstały przy udziale znacznej liczby osobników rodzicielskich (brak symptomów zawężenia puli genowej). Ocena N_e dla populacji siewek pozyskanych z populacji rodzicielskiej M1, mimo niewielkiej liczebności próby wykazała znaczną wartość efektywnej wielkości populacji ($N_e = 116,4$; Tabela 12), co oznacza znaczną liczebność populacji rodzicielskiej. Związane to może być ze zjawiskiem zarówno dopływu genów na skutek dyspersji nasion, ale również dopływu genów na skutek dyspersji pyłku.

Oceny efektywnej wielkości populacji dla potomstwa (zarodki nasion) drzew traktowanych jako osobniki mateczne były znaczne i wyniosły 40,8 oraz 55,0, odpowiednio dla populacji M1 i M2. Należy jednak pamiętać, że wynik ten jest zdeterminowany przez niewielką liczbę osobników matecznych ($N_{ef} = 10$) tworzących każdą z tych populacji. Przy założeniu

teoretycznym, że efektywna liczba osobników rodzicielskich tworzących populację potomną nie może być większa niż $4N_{ef}$, oraz biorąc pod uwagę faktyczną liczbę matek (10), należy wnioskować, że efektywna liczba osobników ojcowskich biorących udział w procesach zapylania była znaczna (wielokrotnie większa od liczby matek), nie będąc czynnikiem ograniczającym zmienność genetyczną populacji potomnej.

Tabela 9. Ocena efektywnej wielkości populacji oszacowana dla poszczególnych badanych subpopulacji w oparciu o model nierównowagi gametycznej, wraz z 95% przedziałem ufności/

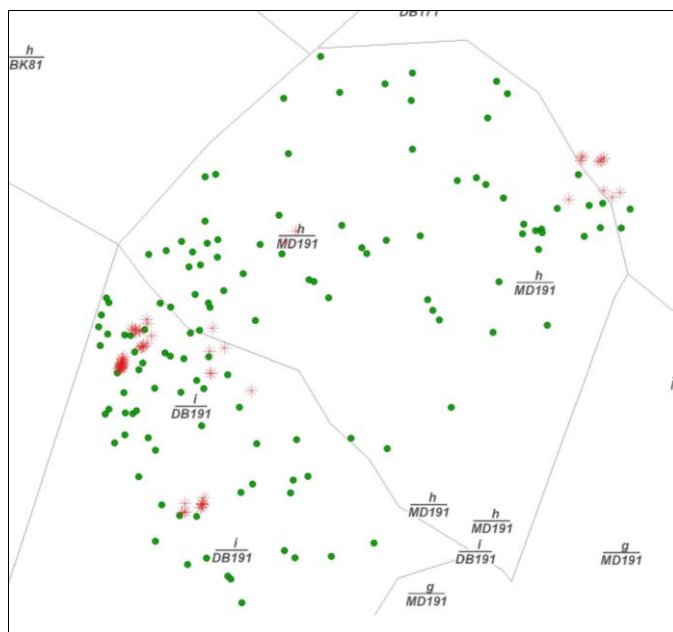
Subpopulacja	Liczebność	N_{eLD}	95% C.I.
M1 (dorosłe)	126	94,6	73,6-126,4
M2 (dorosłe)	126	83,8	69,2-103,6
S1 (siewki)	81	116,4	87,3-166,8
N1 (nasiona M1)	300	40,8	36,3-45,8
N2 (nasiona M2)	300	55,0	48,4-62,5

3.5. Analizy rodzicielstwa

Analizy rodzicielstwa przeprowadzono osobno dla kohorty siewek oraz dla populacji zarodków skielkowanych nasion pozyskanych z drzew matecznych.

3.5.1. Siewki powstałe z naturalnego odnowienia

Siewki wykorzystane do badań były niejednorodnie rozmieszczone na badanej powierzchni (rycina 1). Największe skupisko siewek odnotowano w części zachodniej oraz północno-wschodniej powierzchni badawczej. Na uwagę zasługuje fakt, że wiele siewek znajduje się wręcz na skraju występowania osobników dorosłych traktowanych jako populacja rodzicielska.



Rycina 1. Schemat rozmieszczenia osobników dorosłych (zielone kółka) oraz siewek (czerwone gwiazdki) na powierzchni badawczej M1.

Analizy przeprowadzone w oparciu o model sąsiedztwa wykazały, że dla 28% siewek nie odnaleziono żadnego rodzica w lokalnej populacji osobników dorosłych (tabela 10). Oznacza to, że badane siewki powstały w oparciu o nasiona, z których 28% pochodziło spoza badanej populacji, stanowiąc pulę tzw. imigracji nasion. Parametry krzywej dyspersji nasion zachodzącej w ramach lokalnej populacji wskazują na krzywą typu platykurtycznego ($b_s = 2,067$), czyli krzywą cienko-ogonową. Oznacza to, że większość nasion podlega dyspersji na niewielkie odległości. Średnia odległość dyspersji nasion została oceniona na 37,5 m, przy czym przedział ufności tego parametru jest stosunkowo wąski (Tabela 11). Dyspersja nasion miała charakter kierunkowy, bowiem istotny okazał się parametr opisujący skalę anizotropii dyspersji (k_s). Parametr $a_s = 0,1607$ wskazuje, że większość nasion podlegała dyspersji z kierunku o azymucie 57,6 stopni, czyli N-E. Tym niemniej, na ten wynik mogło mieć wpływ nielosowe rozmieszczenie siewek w stosunku do osobników rodzicielskich.

Zbadano również w jakim stopniu indywidualne cechy fenotypowe, takie jak wysokość lub pierśnica drzewa, mają wpływ na żeński sukces reprodukcyjny obserwowany w stadium siewek. Okazało się, że jedynie w przypadku pierśnicy odnotowano istotny statystycznie dodatni liniowy wpływ wartości tej cechy na żeński sukces reprodukcyjny (istotna wartość tzw. gradientu selekcji). Oznacza to, że osobniki o większych rozmiarach mają większe prawdopodobieństwo sukcesu reprodukcyjnego.

Tabela 10. Parametry dyspersji nasion i pyłku u *Larix decidua* subsp. *polonica* oszacowane na podstawie modelu kojarzenia w sąsiedztwie. Wyniki otrzymano dla dwóch zestawów danych: siewek powstałych w drodze naturalnego obsiewu oraz nasion pozyskanych z wybranych drzew traktowanych jako drzewa mateczne. Parametry zapisane pogrubioną czcionką są istotne statystycznie ($p < 0,05$); w nawiasach podano wartości błędu standardowego.

Parametry systemu kojarzenia i dyspersji	Siewki		Nasiona (dyspersja pyłku)		
	Dyspersja nasion	Dyspersja pyłku	Populacja M1	Populacja M2	Razem
Samozapłodnienie (s)	-	0,00	0,0434 (0,0121)	0,0099 (0,0063)	0,0268 (0,0068)
Imigracja (m_s, m_p)	0,2804 (0,0598)	0,5473 (0,0759)	0,3731 (0,0308)	0,4239 (0,0318)	0,4056 (0,0221)
Odwrotność średniej odległości dyspersji (d_s, d_p)	0,0267 (0,0035)	0,0270 (0,0115)	0,0066 (0,0040)	0,0011 (0,0034)	0,0053 (0,0033)
Kształt krzywej dyspersji (b_s, b_p)	2,0670 (0,7564)	0,6651 (0,3444)	0,3155 (0,1090)	0,1837 (0,1600)	0,2970 (0,0944)
Intensywność anizotropii dyspersji (k_s, k_p)	1,2804 (0,3311)	0,4712 (0,5321)	1,4122 (0,1620)	1,5316 (0,1707)	1,4528 (0,1162)
Główny kierunek (azymut) dyspersji (a_s, a_p)	0,1607 (0,0350)	0,9501 (0,2079)	0,0573 (0,0149)	0,0677 (0,0146)	0,0611 (0,0105)
<i>Determinanty sukcesu reprodukcyjnego (gradienty selekcji)</i>					
DBH	0,7791 (0,1774)	-	0,6812 (0,1115)	0,6961 (0,1527)	0,6930 (0,0903)
DBH ²	-	-	-0,2348 (0,0609)	-0,1055 (0,1151)	-0,2222 (0,0528)

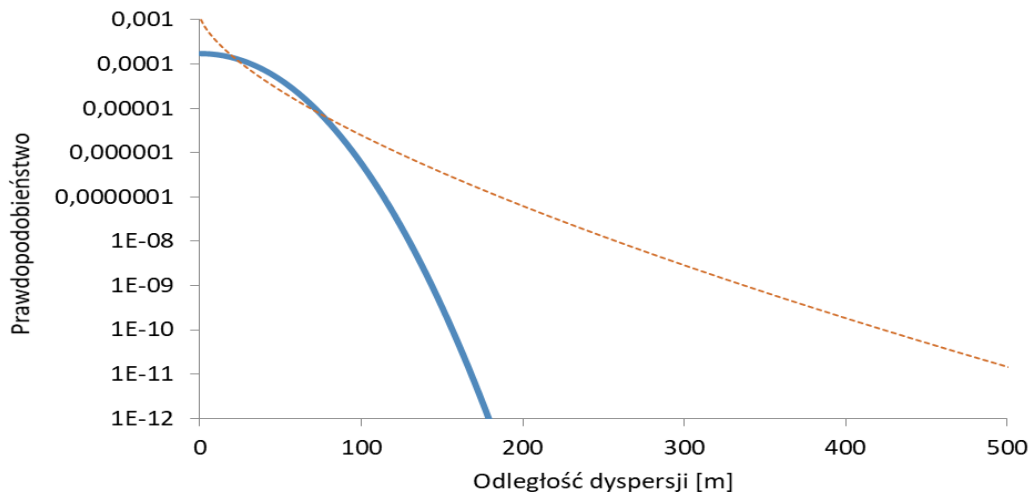
Wśród siewek dla których odnotowano co najmniej jednego osobnika rodzicielskiego ($0,7196=1-m_s$), aż 54% to osobniki które powstały przy udziale pyłku pochodzącego spoza lokalnej populacji. Wartość tę należy traktować jako poziom imigracji pyłku spoza lokalnej populacji. Oznacza to, że w sumie tylko około 26 siewek (31,62%) powstało przy udziale obu osobników rodzicielskich $[(1-m_s)*(1-m_p)]$. Tak niewielka liczba osobników potomnych była podstawą oceny parametrów świadczących o przebiegu procesów zapylenia między osobnikami lokalnej populacji, co miało swoje konsekwencje w niewielkiej precyzji otrzymanych wyników. Oceniona w ten sposób krzywa dyspersji pyłku okazała się leptokurtyczna ($b_s=0,665$), czyli tzw. grubo-ogonowa. Średnia odległość dyspersji została oszacowana na poziomie podobnym jak w przypadku nasion (36,98 m), jednak przedział

ufności tej oceny był w tym przypadku znacznie szerszy (Tabela 11). Należy zwrócić uwagę, że parametr b_s nie był istotny statystycznie biorąc pod uwagę wartość oceny błędu standardowego. Jednak usunięcie tego parametru z modelu powodowało istotne zmiany prawdopodobieństwa wiarygodności całego modelu statystycznego. W związku z tym należy stwierdzić, że dyspersja pyłku w ramach lokalnej populacji nie miała charakteru losowego. Podobnie, chociaż wskazano dominujący kierunek z którego dochodziło do dyspersji pyłku ($a_s=0,95$; prawie N - północ), parametr intensywności kierunkowości dyspersji był nieistotny statystycznie. Brak istotności statystycznej wspomnianych parametrów mógł w tym wypadku wynikać z niewielkiej liczby siewek, dla których odnotowano oba osobniki rodzicielskie w badanej populacji.

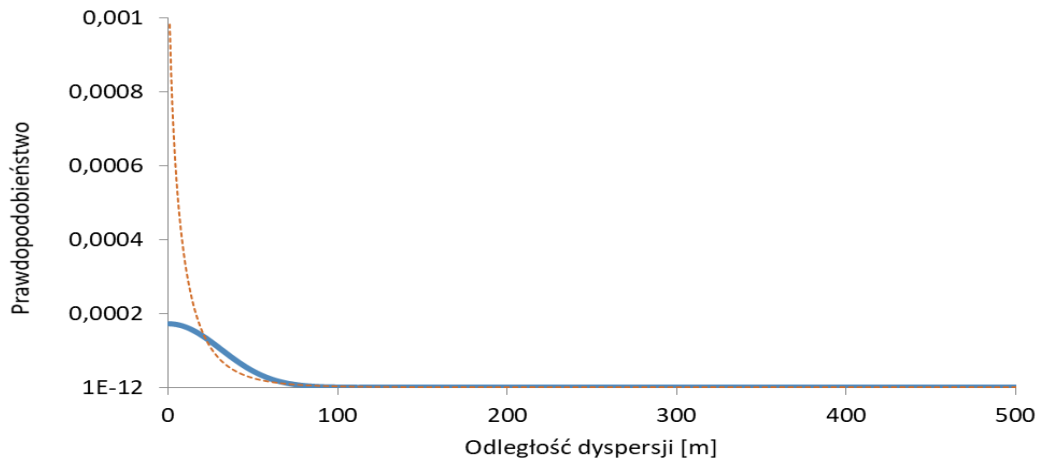
Tabela 11. Średnia odległość dyspersji nasion i pyłku w populacjach *Larix decidua* subsp. *polonica* oraz 95% przedział ufności oszacowane na podstawie pełnego modelu kojarzenia.

Materiał badawczy	Dyspersja nasion/pyłku	Średnia odległość dyspersji [m]	Q[2,5%]	Q[97,5%]
Siewki	<i>Dyspersja nasion</i>	37,489	28,418	55,065
	<i>Dyspersja pyłku</i>	36,984	20,382	199,388
<i>Dyspersja pyłku</i>				
Nasiona	Populacja M1	151,692	62,749	Inf.
	Populacja M2	903,487	106,507	Inf.
	Razem	190,629	76,382	Inf.

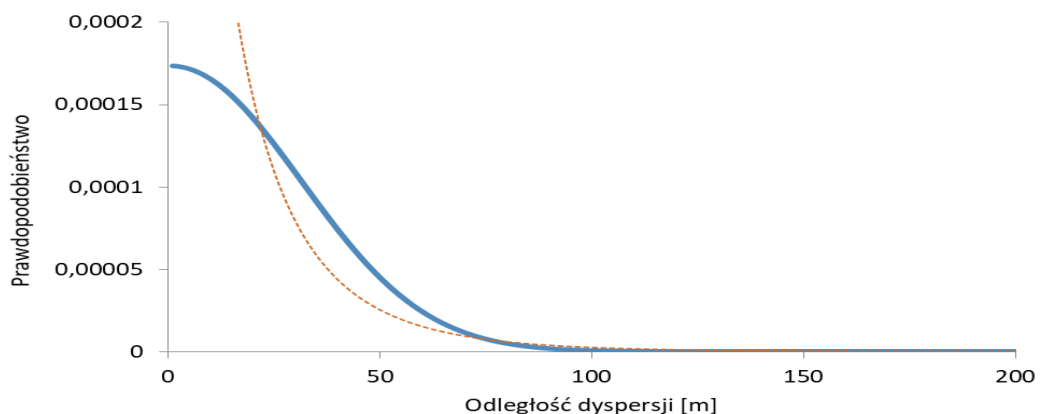
Należy zwrócić uwagę, że chociaż dla danych pochodzących z siewek oszacowano podobne wartości średniej odległości dyspersji nasion i pyłku, to różny kształt krzywej dyspersji pokazuje, że o ile w przypadku nasion prawdopodobieństwo dyspersji maleje stopniowo wraz z odległością dyspersji, to w przypadku pyłku prawdopodobieństwo to szybko maleje w pierwszych klasach dystansu by następnie utrzymywać się na niskim poziomie, zmieniając się nieznacznie wraz z odległością (rycina 2-4). Oznacza to, że w przypadku nasion istnieje niewielka szansa na daleką dyspersję nasion, natomiast w przypadku pyłku istnieje niewielkie, jednak realne prawdopodobieństwo rzadkich zdarzeń dalekiej dyspersji pyłku. Oznacza to, że dyspersja pyłku ma charakter bardziej losowy niż dyspersja nasion.



Rycina 2. Rozkład prawdopodobieństwa dyspersji nasion (linia ciągła) oraz dyspersji pyłku (linia przerywana) określony na podstawie parametrów oszacowanych dla populacji siewek (logarytmiczna skala prawdopodobieństwa).

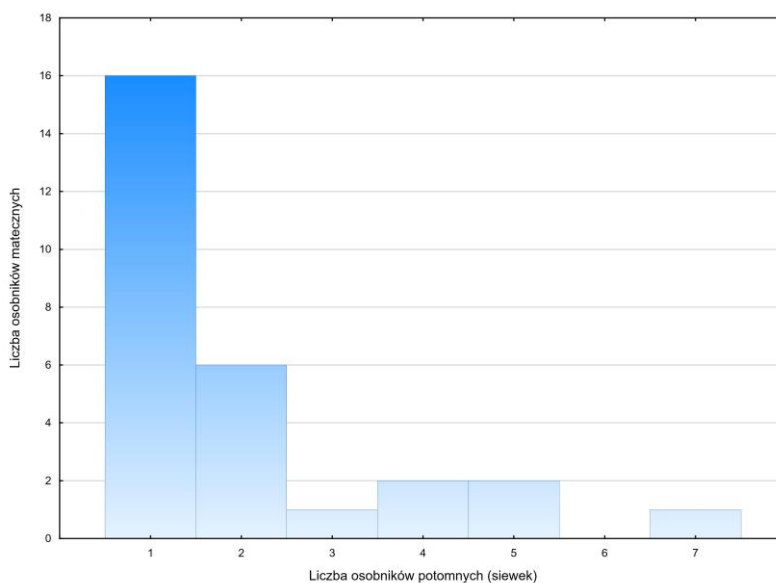


Rycina 3. Rozkład prawdopodobieństwa dyspersji nasion (linia ciągła) oraz dyspersji pyłku (linia przerywana) określony na podstawie parametrów oszacowanych dla populacji siewek (liniowa skala prawdopodobieństwa).



Rycina 4. Rozkład prawdopodobieństwa dyspersji nasion (linia ciągła) oraz dyspersji pyłku (linia przerywana) określony na podstawie parametrów oszacowanych dla populacji siewek (liniowa skala prawdopodobieństwa, skala dystansu ograniczona do 200 metrów).

Udział osobników rodzicielskich lokalnej populacji w tworzeniu pokolenia siewek, rozpatrywano osobno z perspektywy żeńskiego i męskiego sukcesu reprodukcyjnego. Należy zaznaczyć, że zastosowany model kojarzenia zakłada, że jeśli mamy do czynienia tylko z jednym rodzicem lokalnej populacji, to jest to osobnik żeński. Pula 56 siewek, dla których zidentyfikowano co najmniej jednego rodzica powstała przy udziale 28 osobników funkcjonalnie żeńskich (osobniki mateczne). Ich sukces reprodukcyjny wahał się w zakresie od 1 do 7 osobników potomnych (rycina 5). Natomiast pula 24 siewek dla których zidentyfikowano oba osobniki rodzicielskie w lokalnej populacji powstała przy udziale 22 osobników funkcjonalnie męskich. Oznacza to, że w tym wypadku poszczególne osobniki były zazwyczaj ojcem tylko jednej siewki. Wynik ten pokazuje, że chociaż liczba siewek generalnie jest niewielka, i znaczna ich część jest wynikiem imigracji nasion lub kojarzenia się z osobnikami spoza lokalnej populacji, to pula siewek powstałych w drodze kojarzeń osobników lokalnych posiada stosunkowo szeroką reprezentację osobników rodzicielskich. Nie odnotowano sytuacji nadmiernej dominacji jakichkolwiek osobników, jako osobników męskich lub żeńskich.



Rycina 5. Liczba osobników matecznych biorących udział w tworzeniu pokolenia potomnego w oparciu o próbę siewek pozyskanych w subpopulacji M1.

3.5.2. Nasiona pozyskane z wybranych drzew matecznych

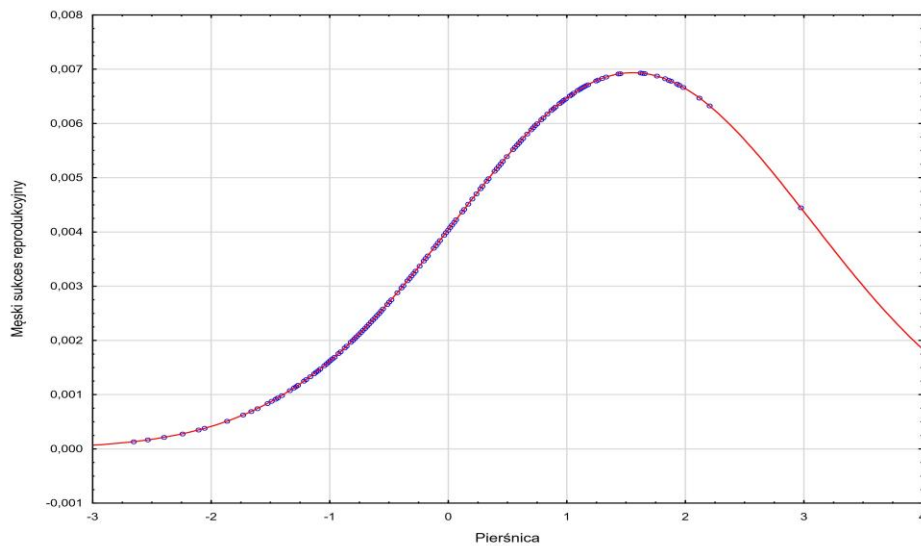
W każdej z badanych subpopulacji wyznaczono po 10 drzew, z których pozyskano nasiona w celu oceny systemu kojarzenia, przepływu genów i przebiegu procesów reprodukcyjnych zachodzących w lokalnej populacji. Badania przeprowadzono osobno dla każdej subpopulacji i dla obu populacji łącznie. Wyniki analiz przedstawiono w tabeli 10 i 11.

Chociaż w przypadku siewek nie odnotowano osobników, które mogły powstać w drodze samozapylenia, w przypadku nasion pozyskanych z drzew matecznych odnotowano niski, jednak istotny statystycznie poziom samozapłodnienia. Wyniósł on średnio 2,68%, ale różnił się między badanymi subpopulacjami, i o ile w subpopulacji M2 był nieistotny statystycznie, o tyle w populacji M2 był znaczny i wyniósł 4,43%, będąc parametrem istotnym statystycznie.

Poziom migracji pyłku od osobników zlokalizowanych poza badanymi populacjami był niższy, niż ten notowany w stadium siewek. Wyniósł on średnio 40,56%, różniąc się nieznacznie między subpopulacją M1 (37,31%), a subpopulacją M2 (42,39%). Odwrotność średniej odległości dyspersji pyłku okazała się nieistotna statystycznie. Świadczy to o tym, że dyspersja pyłku w lokalnej populacji ma charakter stosunkowo losowy. Rzeczywiście oceniona średnia odległość dyspersji pyłku dla każdej z subpopulacji oraz łącznych danych została oszacowana na wysokim poziomie (ponad 150 m; tabela 11). Należy jednak zwrócić uwagę, że przedział ufności tego parametru jest prawostronnie otwarty świadcząc nie tylko o ograniczonej precyzji oceny tego parametru, ale również o znacznej skali dyspersji pyłku. Kształt krzywej dyspersji pyłku był niższy niż dla danych pochodzących z siewek (tabela 10). Wartości istotne statystycznie dla subpopulacji M1 i połączonych danych wskazują wyraźnie na krzywą grubo-ogonową (leptokurtyczną), co oznacza, że chociaż prawdopodobieństwo kojarzenia szybko maleje w pierwszych klasach dystansu to później utrzymuje się na wyrównanym poziomie. Może to świadczyć o tym, że do kojarzenia się w lokalnej populacji dochodzi najczęściej między bliskimi sąsiadami, natomiast dla osobników bardziej oddalonych od siebie odległość między nimi nie jest dobrym predyktorem prawdopodobieństwa kojarzenia.

Dla obu subpopulacji odnotowano istotną kierunkowość dyspersji pyłku (istotne parametry k_p). Wartość parametru a_p bliska 0,06 oznacza, że pyłek docierał do drzew matecznych z kierunku około 21 stopni, czyli generalnie N-NE (Tabela 10).

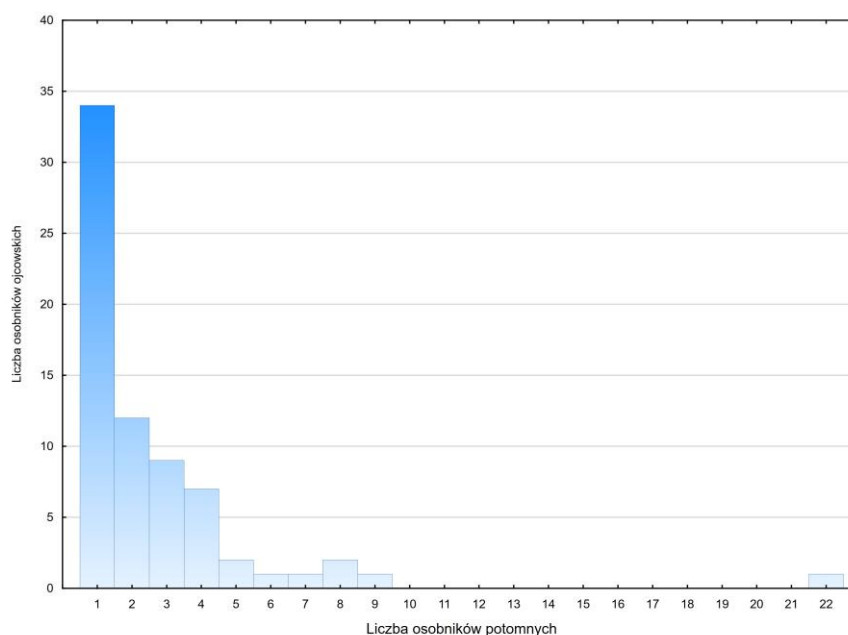
Męski sukces reprodukcyjny okazał się zależny jedynie od pierśnicy drzewa. Była to jednak zależność nieliniowa, bowiem istotny okazał się komponent liniowy i kwadratowy funkcji sukcesu reprodukcyjnego (DBH oraz DBH^2). Analiza przebiegu funkcji sukcesu reprodukcyjnego (rycina 6) wskazuje, że największy sukces odnosiły osobniki o standaryzowanej wartości pierśnicy równej ok 1,5, co odpowiada pierśnicy 100 cm, przy średniej dla populacji ok 72 cm. Powyżej tej wartości pierśnicy sukces nieznacznie malał. Wynik ten podkreśla, że osobniki o ponad przeciętnych rozmiarach mają większą szansę na przekazanie swoich genów pokoleniu potomnemu.



Rycina 6. Zależność męskiego sukcesu reprodukcyjnego od rozmiarów piersznicy drzewa (wartości standaryzowane).

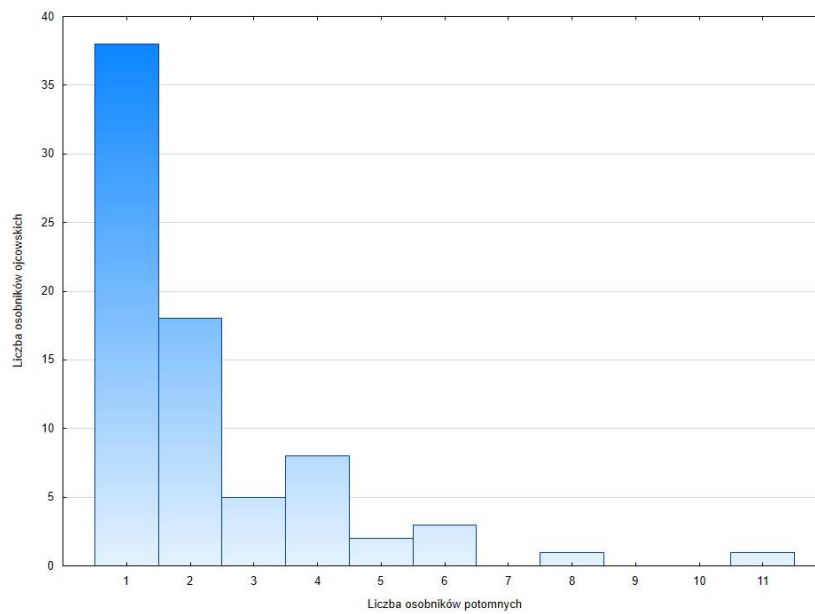
Interesującym wydaje się szczegółowe prześledzenie udziału poszczególnych drzew jako osobników funkcjonalnie męskich. W subpopulacji M1 poziom imigracji pyłku był zmienny dla różnych drzew matecznych. Udział nasion powstałych przy udziale obcego pyłku pochodzących od osobników spoza lokalnej populacji wyniósł od 23,33% (drzewa nr 42 i 61) do 70% (drzewo nr 33). W populacji M1 odnotowano aż 12 nasion, które mogły być wynikiem samozapłodnienia, i były to nasiona zebrane z drzew oznaczonych jako 25 (2); 51 (1), 61 (3), 66 (1), 84 (2), 92 (3); (w nawiasach podano liczbę nasion będących efektem samozapylenia). Na uwagę zwracają drzewa 66 i 92, u których odnotowano po 3 nasiona powstałe po samozapłodnieniu, co stanowi 10% nasion zbadanych z tych drzew.

W subpopulacji M1 lokalnymi ojcami było 70 osobników, które przyczyniły się do ojcostwa od 1 do 22 osobników potomnych. Aż 33 osobniki były ojcem pojedynczych nasion. Największy męski sukces reprodukcyjny odnotował osobnik o numerze 43 będący ojcem aż 22 osobników potomnych (nasion), przy czym wszystkie te nasiona były nasionami osobnika matecznego o numerze 42. Obok tych 22 nasion drzewa matecznego 42, jedno nasiennie powstało przy udziale pyłku pochodzącego od osobnika nr 41, a pozostałe 7 powstało przy udziale obcego pyłku pochodzącego spoza lokalnej populacji. Wynik ten jest o tyle ciekawy, że oba drzewa znajdowały się na południowo-zachodnim skraju powierzchni badawczej. W sumie odnotowano kilka par osobników posiadających wspólne potomstwo, i z reguły były to osobniki sąsiadujące: 25/28 (4), 42/43 (22), 51/52 (7); 65/66 (9), 113/114 (8), (w nawiasach podano liczbę nasion będących efektem wzajemnego zapylenia). Frekwencję osobników ojcowskich w zależności od liczby potomstwa przedstawia rycina 7.



Rycina 7. Liczba osobników ojcowskich biorących udział w tworzeniu pokolenia potomnego w oparciu o próbę nasion pozyskanych z 10 drzew matecznych subpopulacji M1.

W subpopulacji M2 poziom imigracji pyłku był również zmienny dla różnych drzew matecznych. Udział nasion powstałych przy udziale obcego pyłku pochodzących od osobników spoza lokalnej populacji wyniósł od 26,67% (drzewo 227) do 63,33% (drzewa 201 i 210). W populacji M2 odnotowano 3 nasiona, które mogły być wynikiem samozapłodnienia, i były to pojedyncze nasiona zebrane z drzew oznaczonych jako 173, 193, 222. Lokalnymi ojcami było 76 osobników, które przyczyniły się do ojcostwa od 1 do 11 osobników potomnych. Największy męski sukces reprodukcyjny odnotował osobnik o numerze 216 będący ojcem 11 osobników potomnych (nasion), przy czym aż 7 były to nasiona osobnika 216. Frekwencję osobników ojcowskich w zależności od liczby potomstwa przedstawia rycina 8.



Rycina 8. Liczba osobników ojcowskich biorących udział w tworzeniu pokolenia potomnego w oparciu o próbę nasion pozyskanych z 10 drzew matecznych subpopulacji M2.

4. WNIOSKI KOŃCOWE

Szczegółowa dyskusja otrzymanych wyników zostanie przedstawiona w przygotowywanej publikacji. Poniżej prezentujemy najważniejsze wyniki i wnioski będące wynikiem przeprowadzonych badań.

1. Przeprowadzone badania wykazały wysoki poziom zmienności genetycznej modrzewia rosnącego na Chełmowej Górze, podobny do tego jaki podaje się w literaturze dla populacji modrzewia europejskiego w Europie.
2. Poziom zmienności populacji potomnych jest porównywalny, lub nawet większy niż populacji rodzicielskich rosnących w centralnej części rezerwatu. Może się to wiązać ze zjawiskiem dopływu genów do badanych populacji.
3. W populacji potomnej nasion pozyskanych z drzewostanu M1 odnotowano istotny statystycznie poziom wsobności, który miał związek ze zdarzeniami samozapłodnienia obserwowanymi w tej puli nasion.
4. Stopień zróżnicowania genetycznego między badanymi populacjami był niewielki, a w przypadku porównań między populacją osobników dorosłych i potomnych wywodzących się z tego samego obszaru, z reguły nieistotny statystycznie.
5. Wszystkie badane populacje potomne charakteryzowały się wysokimi wartościami efektywnej wielkości populacji.
6. W populacji siewek nie odnotowano przestrzennej struktury genetycznej.
7. Samozapłodnienie odnotowano jedynie w populacji nasion pozyskanych z wybranych drzew matecznych. Szczegółowe analizy wykazały, że cecha ta (poziom samozapłodnienia) była zmienna dla poszczególnych drzew matecznych i wahała się w zakresie 0 do ok 10%. Obie subpopulacje różniły się pod względem średniego poziomu samozapłodnienia tak, że w subpopulacji M1 poziom samozapłodnienia wyniósł ok. 4%, a w populacji M2 nie stwierdzono istotnego poziomu samozapłodnienia.
8. W populacji siewek (S1) nie odnotowano przypadków osobników powstałych w wyniku samozapłodnienia (dotyczy to jedynie grupy osobników, dla których zidentyfikowano co najmniej jednego osobnika rodzicielskiego w lokalnej populacji).
9. Populacja siewek powstała przy udziale ok 28% nasion pochodzących spoza badanej populacji. Jednocześnie poziom imigracji pyłku prowadzący do powstania badanej populacji siewek wyniósł blisko 55%.

10. Poziom imigracji pyłku obserwowany w stadium nasion pozyskanych z wybranych drzew matecznych był umiarkowany i wahał się w granicach ok 40%.
11. Udział osobników rodzicielskich w tworzeniu pokolenia siewek był zróżnicowany w zależności tego, czy rozpatrywano żeński, czy męski sukces reprodukcyjny. Żeński sukces reprodukcyjny był bardziej zróżnicowany, natomiast męski sukces reprodukcyjny miał charakter zrównoważony.
12. Męski sukces reprodukcyjny był umiarkowanie zróżnicowany, bowiem zależnie od badanej populacji najbardziej efektywny osobnik ojcowski był rodzicem 11 (subpopulacja M2), bądź nawet 22 (subpopulacja M1) osobników potomnych.
13. Odnotowano, iż zarówno męski, jak i żeński sukces reprodukcyjny poszczególnych osobników związany był z wielkością pierścicy drzewa.
14. Odnotowany w niniejszych badaniach poziom imigracji pyłku jest porównywalny do innych populacji drzew iglastych. Stwierdzony poziom imigracji należy jednak rozpatrywać w kontekście ograniczeń eksperymentalnych przeprowadzonych badań, tzn. wyznaczenia do badań w sumie niewielkich poletek badawczych. Krzywe dyspersji nasion i pyłku (wyznaczone przez odpowiednie parametry) pokazują, że imigracja nasion spoza rezerwatu jest bardzo ograniczona i nie stanowi zagrożenia dla integralności i odrębności genetycznej populacji modrzewia wstępującej w rezerwacie. Z drugiej strony, lepokurtyczna krzywa dyspersji pyłku sugeruje, że poziom imigracji pyłku jest w dużym stopniu niezależny od wielkości powierzchni badawczych i może stanowić czynnik mający realny ujemny wpływ na integralność puli genowej rezerwatu.

Literatura

1. Bałut S. 1962. Zmienność niektórych cech w populacjach modrzewi z Gór Świętokrzyskich, Beskidów i Sudetów jako podstawa wyróżniania gospodarczo cennych ekotypów. *Acta Agr. et Silv. Ser. Silv.* 2:3-43.
2. Barański S. 1970. Występowanie i uprawy modrzewia rodzimego pochodzenia w świętokrzyskich lasach rządowych w pierwszej połowie XIX wieku. *Acta Agr. et Silv. Ser. Silv.* 10: 5-38.
3. Burczyk J., Lewandowski A., Litkowiec M. 2017. *Rozpoznanie struktury genetycznej modrzewia polskiego na Chelmowej Górze*. Raport końcowy zadania zleconego przez ŚPN. 23 pp.
4. Burczyk, J., Adams, W.T., Birkes, D.S., Chybicki, I.J., 2006. Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. *Genetics* 173, 363-372.
5. Chybicki I.J., 2018. NMpi - improved re-implementation of NM+, a software for estimating gene dispersal and mating patterns. *Mol Ecol Resour* 18: 159-168. doi:10.1111/1755-0998.12710
6. Chybicki I.J., Burczyk J. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *J Hered.* 100,106-113. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esn088>.
7. Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., Tillett B.J., Ovenden J.R. 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*. 14: 209-214.
8. Hardy O.J., Vekemans X. 2002. Spagedi: a versatile computer program to analyses spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes*. 2, 618-620. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x>.
9. Isoda K., Watanabe A. 2006. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi*. *Molecular Ecology*, 6, 664–666.
10. Litkowiec M., Lewandowski A., Burczyk J. 2018. Genetic status of Polish larch (*Larix decidua* subsp. *polonica* (Racib. Domin)) from Chelmowa Mountain: implications for gene conservation. *Dendrobiology* (submitted).
11. Raciborski M. 1890. Kilka słów o modrzewiu w Polsce. *Kosmos* 15: 488-497.
12. Wagner S., Gerber S., Petit R.J. 2012. Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch). *Molecular Ecology Resources* 10.1111/j.1755-0998.2012.03139.x