

URSZULA NAWROCKA-GRZEŚKOWIAK, LIDIA SKUZA, IZABELA SZUĆKO

Zmienność genetyczna cisa w wybranych rezerwach Polski

Genetic variability of yew in the selected Polish nature reserves

ABSTRACT

Nawrocka-Grześkowiak U., Skuza L., Szućko I. 2015. Zmienność genetyczna cisa w wybranych rezerwach Polski. Sylwan 159 (6): 491-497.

Genetic variability of yew (*Taxus baccata* L.) trees in seven nature reserves (Jasień, Czarne Człuchowskie, Choczewo, Wierzchlas, Wirty, Rokita and Mogilno/Stary Sącz) in Poland was investigated by RAPD methods. The results showed high genetic differences between populations ranging from 22.7% among the population of Stary Sącz and hedge (+) to 86.1% between Wierzchlas and Rokita (+). Based on the results of RAPD analyses, the studied populations were divided into three groups of similarity. The first include Jasień and Choczewo the populations, the second Rokita (+), hedge (-) and Stary Sącz, and the third remaining populations. High level of genetic diversity was showed among the studied populations, is essential to the adaptability of the population of yew. This theoretically increases the chances of survival species thanks to the possibility of passing to preferred combinations of genes to the future generations.

KEY WORDS

genetic diversity, molecular markers, *Taxus baccata*, nature reserve

ADDRESSES

Urszula Nawrocka-Grześkowiak ⁽¹⁾ – e-mail: urszula.nawrocka@onet.eu

Lidia Skuza ^(2, 3) – e-mail: skuza@univ.szczecin.pl

Izabela Szućko ^(2, 3) – e-mail: izabela.szucko@univ.szczecin.pl

⁽¹⁾ Katedra Meteorologii i Kształtowania Terenów Zieleni, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie; ul. Papieża Pawła VI 3a, 71-459 Szczecin

⁽²⁾ Katedra Biologii Komórki, Uniwersytet Szczeciński; ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin

⁽³⁾ Centrum Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet Szczeciński; ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin

Wstęp

Rodzaj *Taxus* obejmuje 8 blisko spokrewnionych gatunków [Seneta, Dolatowski 2012], choć według niektórych autorów jest ich tylko 7 [Thomas, Polwart 2003]. Cis pospolity (*Taxus baccata* L.) podlega ochronie gatunkowej [Rozporządzenie... 2004], został również wpisany do Polskiej Czerwonej Księgi Roślin [Kruszelnicki 2001] jako gatunek narażony na wyginięcie. Występuje w umiarkowanej strefie całej półkuli północnej. W Polsce osiąga swoją wschodnią granicę zasięgu [Namvar, Spethmann 1986]. Najwięcej stanowisk tego gatunku znajduje się na Pojezierzu Pomorskim, w Małopolsce, na Śląsku, Podkarpaciu i w Górach Świętokrzyskich. Rozwój cisa ogranicza głównie światło [Iszkuło, Boratyński 2006], ale także gleba. Cis może rosnąć prawie na każdym podłożu [Król 1975], ale preferuje gleby wapienne, dostatecznie wilgotne i głębokie.

Jak pokazują doświadczenia, rośnie także na glebach suchych i ubogich siedliskach borowych, ale w okolicy zbiorników wodnych [Nawrocka-Grzeškowiak, Frydel 2009].

Celem pracy było poznanie zmienności i genetycznego zróżnicowania wśród wybranych populacji cisu pospolitego rosnącego w różnych regionach Polski (nie tylko w rezerwach) z zastosowaniem markerów RAPD. Badanie to pozwala określić, jak duża jest zmienność w tych kilku rezerwach, z których są i będą pobierane nasiona do dalszej produkcji siewek. Zróżnicowanie genetyczne jest korzystne dla realizacji programu ochrony i restytucji cisu [Zarządzenie... 2006], który zakłada m.in. czynną ochronę istniejących populacji oraz zakładanie zachowawczych plantacji, a także większego udziału cisu w lasach, do czego przyczyni się zakładanie plantacji nasiennych. Plantacje, z których w przyszłości będzie można zbierać nasiona, są już zakładane w Nadleśnictwie Kaliska w programie restytucji cisu w tym terenie [Nawrocka-Grzeškowiak, Frydel 2009].

Materiał i metody

Materiał do badań zebrano w rezerwach Jasień, Czarne Człuchowskie, Choczewo, Wierzchlas, Wirty, Rokita i Mogilno. Rezerwat „Choczewskie Cisy” (Nadleśnictwo Choczewo) o powierzchni 9 ha leży w północno-zachodniej części nadleśnictwa (leśnictwo Sasino) i jest jednym z bogatszych stanowisk pomorskich. Wiek najstarszych egzemplarzy szacuje się na 115 lat. Siewki cisu występują pojedynczo (wiek 1-3 lata) i widać, że populacja tego gatunku jest w wyraźnej regresji. Rezerwat „Cisy w Czarnem” (Nadleśnictwo Czarne Człuchowskie, leśnictwo Dzików) o powierzchni około 25-26 ha (podaje się różne wielkości) leży między górnym biegiem rzeki Gwdy a jej dopływem Czernicą. Jednoroczne siewki cisu są nieliczne, starsze cisy (4-8-letnie) osłaniania się metalowymi kołpakami. W rezerwacie „Cisy Staropolskie im. Leona Wyczółkowskiego” (Nadleśnictwo Zamrzenica, leśnictwo Wierzchlas) rosną najstarsze okazy w Polsce (około 400 lat). Naloty cisowe pojawiają się wiosną corocznie, ale w późniejszym okresie zamierają. Rezerwat „Jasień” (Nadleśnictwo Gidle, leśnictwo Żytno) o powierzchni 19,71 ha jest jednym z najbardziej wilgotnych borów. Cisy na tym terenie rosną w grupach lub pojedynczo i mają dwie formy: drzewiastą oraz krzewiastą. Młode siewki (roczne) rosną głównie w miejscach wyżej położonych w pobliżu pni drzew, tworząc skupienia, a starsze (3-5-letnie) są w dużym stopniu uszkodzone przez zwierzynę. Rezerwat „Cisy Rokickie im. Profesora Stanisława Króla” o powierzchni 17,41 ha położony jest na Pomorzu Szczecińskim w lasach Nadleśnictwa Rokita. Najstarsze egzemplarze drzew cisowych rosną w szpalerze wysadzonym obok opłotowania. Pierwsze wzmianki o cisach na tym terenie pochodzą od Müllera [1911]. Młode siewki można zauważyć tylko na obrzeżu i na odsłoniętych leśnych polanach położonych w sąsiedztwie. Rezerwat „Cisy w Mogilnie” o powierzchni 35,67 ha położony jest w Beskidzie Zachodnim, na zboczu Jodłowej Góry (651 m n.p.m.) i należy do Nadleśnictwa Stary Sącz (leśnictwo Mogilno). Na terenie można spotkać drzewa cisu, ale także okazy rosnące krzewiasto. Siewki pojawiają się wiosną, wiele z nich ginie.

W celu scharakteryzowania populacji cisu stosowano szereg markerów, m.in. markery morfologiczne, cytologiczne, biochemiczne oraz markery DNA. O jakości markera decyduje jego sposób dziedziczenia oraz ujawniany, dzięki jego zastosowaniu, poziom polimorfizmu. Markery DNA są niezależne od warunków środowiska, ujawniają wysoki poziom polimorfizmu i dlatego są uważane za bezcenne narzędzia do określania relacji genetycznych. Technika RAPD umożliwia precyzyjną identyfikację relacji filogenetycznych między genotypami roślin.

Materiałem do badań były igły z jednorocznych pędów cisu pospolitego. Badaniami objęto cis pospolity rosnący na terenie siedmiu wybranych rezerwatów. Oprócz cisów z rezerwatów przebadano rośliny charakterystyczne dla gatunku *Taxus baccata* rosnące w Arboretum w Wirtach

oraz na terenie rezerwatu Rokita w starym żywopłocie otaczającym dawną leśniczówkę: męski egzemplarz – oznaczony jako żywopłot (-) i żeński – żywopłot (+). Cisy z rezerwatu w Rokicie oznaczono dodatkowo jako Rokita (+) (egzemplarze żeńskie) i Rokita (-) (męskie). Drzewa, z których pobierano materiał do badań, charakteryzowały się dobrym stanem zdrowotnym, za wyjątkiem cisów z rezerwatu w Rokicie. Cisy te rosną w dużym zagęszczeniu z małym dostępem światła, co nie wpływa dobrze na ich rozwój.

Genomowy DNA był ekstrahowany z 2 g świeżych igieł za pomocą zestawu Plant&Fungi DNA Purification Kit (EURx). Amplifikacji dokonano przy udziale 15 starterów RAPD. W mieszaninie reakcyjnej o całkowitej objętości 25 μ l znajdowały się odpowiednio: 1 \times bufor do PCR (750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Tween 20) (Fermentas), od 1,5 do 4,0 mM MgCl_2 (w zależności od zastosowanego startera); 200 μ M każdego z dNTP, 0,2 μ M startera (Genomed), Taq DNA polimeraza (Fermentas), 10 ng genomowego DNA. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze MJ Bio-Rad, stosując następujący profil termiczny: denaturacja wstępna przez 3 min w temperaturze 94°C, następnie 45 cykli według profilu: 94°C – 1 min (denaturacja), 37°C – 1 min (przyłączanie starterów), 72°C – 2 min (elongacja) oraz końcowa inkubacja w 72°C przez 10 min. Po reakcji PCR do każdej z prób dodano (5 μ l) buforu obciążającego: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% błękitu bromofenolowego, 0,03% xylenejjanolu FF, 60% glicerolu i 60 mM EDTA. Produkty amplifikacji rozdzielano w 2-procentowym żelu agarozowym (Prona) zawierającym 0,01% bromku etyldyny (Sigma), w buforze 1 \times TBE (kwas borowy, EDTA). Rozdział prowadzono przez 5 h, stosując napięcie 85 V. Reakcje PCR-RAPD powtarzano dwukrotnie dla każdego startera. Analizowano jedynie powtarzalne produkty.

Obrazy produktów reakcji analizowano przy użyciu programu Quantity One® 1-D (BioRad). Wielkość produktów amplifikacji określano poprzez porównanie ich z markerem wielkości MasRuller DNA Ladder, Fermentas. Obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę, którą zapisywano odpowiednio jako wartość 1 lub 0. Otrzymaną w ten sposób macierz podobieństwa opracowano z zastosowaniem współczynnika Dice'a:

$$WD = (x,y) = 2P(x, y) / (P(x) + P(y))$$

gdzie:

$P(x)$, $P(y)$ – prawdopodobieństwo zdarzeń x lub y zachodzących razem.

Skonstruowano także dendrogram podobieństwa genetycznego z użyciem metody najbliższego sąsiedztwa (NJ, ang. Neighbour Joining) (Diversity Database, BioRad, USA).

Wyniki

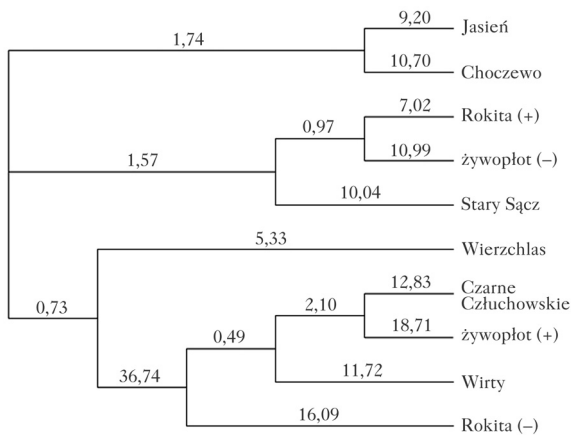
Spośród zastosowanych w pracy 15 starterów 10-nukleotydowych o losowych sekwencjach 6 nie generowało żadnych produktów amplifikacji, dlatego w badaniach zastosowano 9 starterów (tab.). Analizie poddano powtarzalne, intensywne i różniące się długością od fragmentów sąsiednich produkty amplifikacji. Liczba analizowanych prążków to 163 – obejmowała loci polimorficzne, które miały długość od 146 do 2623 par zasad. Liczba fragmentów amplifikowanych przez jeden starter wahała się od 5 w OPA 02 do 28 w OPA 19, ze średnią 18 produktów na starter. Procent polimorficznych prążków oscylował od 76,9% dla startera OPA 10 do 100% dla starterów OPA 04, OPA 09, OPA 11 i OPA 15, z ogólną średnią 94,5% polimorficznych prążków. Wyniki te wskazują na wysokie zróżnicowanie genetyczne badanych populacji.

Wyniki otrzymane po analizie RAPD (ryc.) pozwoliły na uzyskanie podobieństwa genetycznego między analizowanymi populacjami cisa, wahającego się od 22,7% pomiędzy populacjami Stary Sącz i żywopłot (+) do 86,1% pomiędzy populacjami Wierzchlas i Rokita (+). Dendro-

Tabela.

Zastosowane startery RAPD wraz z sekwencją 5'→3' (sekwencja), liczba produktów otrzymanych poszczególnym starterem (N), procent polimorficzności (%) oraz długość otrzymanych produktów (L [pz])
 Primers used in the RAPD and their 5'→3' sequence (sekwencja) as well as products number (N), polymorphism fraction (%) and size (L [bp])

Starter Primer	Sekwencja	N	%	L
OPA 02	TGCCCAGCTG	5	80,0	146-1135
OPA 04	AATCGGGCTG	25	100,0	619-1775
OPA 09	GGGTAACGCC	20	100,0	566-1898
OPA 10	GTGATCGCAG	13	76,9	725-1931
OPA 11	CAATCGCCGT	16	100,0	437-2195
OPA 12	TCGGCGATAG	12	91,7	213-1695
OPA 15	TTCCGAACCC	17	100,0	358-2060
OPA 18	AGGTGACCGT	27	88,9	334-1954
OPA 19	CAAACGTCGG	28	92,9	625-2623
Średnia Average		18	94,5	146-2623



Ryc.

Podobieństwo genetyczne Dice'a badanych populacji *Taxus baccata* wyznaczone metodą najbliższego sąsiedztwa NJ
 Dice genetic similarity of analysed *Taxus baccata* L. populations determined basing on the NJ method

gram NJ przedstawia podział badanych populacji na 3 grupy podobieństwa: do pierwszej należą populacje Jasień i Choczewo, do drugiej Rokita (+), żywoptłot (-) i Stary Sącz, a do trzeciej pozostałe analizowane populacje. W drugiej grupie podobieństwa można wyróżnić dwie podgrupy. Osobną podgrupę tworzy populacja Stary Sącz. Podobnie w trzeciej grupie można wyróżnić podgrupę pierwszą, którą tworzy jedynie populacja Wierzchlas, i drugą, do której należą pozostałe populacje. Na podstawie analizy podobieństwa populacji cisa rosnącego w rezerwacie Rokita i w żywoptłocie można stwierdzić, że cisy te pochodzą od tych, które rosną w żywoptłocie obok rezerwatu. Podobieństwo populacji cisa Rokita (+) i żywoptłot (-) wynosi 82%, a Rokita (-) i żywoptłot (+) 59,4%.

Odnowa cisa pospolitego w badanych rezerwatach jest na ogół bardzo zła, a przyczyną są głównie warunki siedliskowe: duże ocienienie (rezerwat Wierzchlas, Rokita, Jasień i częściowo Choczewo), wilgotność podłoża i podtapianie terenu (Jasień) oraz zgryzanie przez zwierzyne (Jasień i Choczewo). Cisy w badanych rezerwatach na ogół mają dobrą żywotność i pokrój drzewa, ale przyjmują także formę krzewiastą (rezerwat Jasień i Stary Sącz).

Dyskusja

Zmienność genetyczna *T. baccata* była analizowana do tej pory m.in. przy pomocy izoenzymów [Lewandowski i in. 1995; Rajewski i in. 2000]. Nowsze badania *Taxus canadensis* i *T. brevifolia* wykorzystują izoenzymy, RAPD, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) lub polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (AFLP) w celu wyjaśnienia klonalnej zmienności w populacjach, dynamiki populacji oraz struktury metapopulacji [Scher 1996; Corradini i in. 2002]. Markery RAPD stosowane w doświadczeniu zostały również wykorzystane do analizy zróżnicowania regionalnego w szwajcarskich populacjach *T. baccata* L. [Hilfiker i in. 2004] oraz do oceny genomowego zróżnicowania poszczególnych roślin w populacji *T. cuspidata* [Li i in. 2006]. Rozwój technik molekularnych oraz zastosowanie odpowiednich typów markerów molekularnych umożliwiają obecnie precyzyjne określenie poziomu zmienności i zróżnicowania genetycznego badanych populacji oraz rekonstrukcję tras rekolonizacji gatunków z obszarów refugialnych [Petit, Hampe 2006].

Poziom zmienności i zróżnicowania genetycznego mają ważne znaczenie dla zdolności adaptacyjnych populacji i gatunków, co nabiera w ostatnim czasie szczególnego znaczenia w obliczu zachodzących globalnie zmian środowiskowych, w tym przede wszystkim zmian klimatu. Wiedza na ten temat, jak i mechanizmów je kształtujących może być niezmiernie przydatna w tworzeniu programów ochrony gatunków zagrożonych, opracowaniu optymalnej strategii hodowli gatunków o znaczeniu gospodarczym, pozwalając chronić pulę genową i uszlachetniać odmiany. Populacje charakteryzujące się wysokim poziomem różnorodności genetycznej mają teoretycznie większe szanse na przetrwanie dzięki możliwości przekazywania kolejnym pokoleniom korzystnej kombinacji genów.

Analizy genetyczne w oparciu o markery izoenzymatyczne oraz markery DNA wskazują, że cis pospolity, w przeciwieństwie do pozostałych jego gatunków, charakteryzuje się wysokim poziomem zmienności genetycznej wewnątrz populacji i znaczącym zróżnicowaniem genetycznym między populacjami [Lewandowski i in. 1995; Chung i in. 1999]. Ten wysoki poziom zmienności zabezpiecza przed zjawiskiem dryfu genetycznego, który prowadzi do zmniejszenia zmienności wewnątrz populacji – populacje cisa pospolitego w dużym stopniu podatne są na to działanie, co wynika z niewielkich rozmiarów populacji i izolacji przestrzennej stanowisk [González-Martinez i in. 2010], ujemnie wpływających na strukturę genetyczną u tego gatunku.

Poziom zmienności genetycznej cisa pospolitego jest podobny do tego, jaki posiadają inne drzewa iglaste, charakteryzujące się wysokim poziomem zmienności na tle badanych gatunków roślin, jak np. sosna zwyczajna [Hamrick i in. 1992]. Dodatkowo populacje cisa położone w centrum zasięgu charakteryzują się wyższym poziomem zmienności genetycznej w porównaniu z populacjami rosnącymi na granicach zasięgu [González-Martinez i in. 2010].

Doniesienia literaturowe dotyczące struktury genetycznej cisa pospolitego w Polsce, w oparciu o markery izoenzymatyczne [Lewandowski i in. 1995], markery RAPD [Zarek 2009] oraz markery SSR [Chybicki i in. 2011], potwierdzają, że gatunek ten posiada wysoki poziom zmienności genetycznej. Badania Zarka [2009] przeprowadzone w czterech południowych populacjach cisa pospolitego w Polsce z zastosowaniem markerów RAPD wykazały, że zróżnicowanie genetyczne między nimi wynosi 26%, natomiast wewnątrz populacji 74%. Z kolei badania w oparciu o markery SSR przeprowadzone na sześciu populacjach cisa pospolitego (trzech z południa i trzech z północy Polski) wykazały, że ogólny poziom zróżnicowania genetycznego między populacjami wyniósł zaledwie 5,54%.

W niniejszych badaniach do określenia zmienności cisa w wybranych rezerwach Polski wykorzystano metodę RAPD, a do analizy wykorzystano 9 starterów OPA. Wybrane oligonukleotydy amplifikowały łącznie 163 odcinki DNA, z czego 154 (94,5%) były fragmentami polimorficznymi, co jest zgodne z badaniami Zarka [2009], gdzie do analiz RAPD również wykorzystano 9 starterów, które amplifikowały 185 produktów – średnio 21 produktów na starter. Podobne wyniki otrzymali Corradini i in. [2002], którzy analizie poddali *Taxus canadensis*. Całkowita liczba prążków generowanych przez 7 wybranych starterów wyniosła 125 – średnio 18 produktów na starter. Collins i in. [2003] analizowali *T. baccata*, *T. canadensis* i *T. cuspidata*, również wykorzystując markery RAPD. Do swoich badań wykorzystali 10 starterów, które amplifikowały łącznie 201 prążków, z czego 185 było fragmentami polimorficznymi (92%).

Wnioski

- ✦ Wykazano wysokie zróżnicowanie genetyczne między badanymi populacjami, co ma ważne znaczenie dla zdolności adaptacyjnych populacji. Zwiększa to teoretycznie szanse na przetrwanie cisa dzięki możliwości przekazywania kolejnym pokoleniom korzystnej kombinacji genów.
- ✦ Wykazane podobieństwo genetyczne populacji cisa z rezerwatu Rokita i populacji rosnącej w starym żywopłocie otaczającym dawną leśniczówkę wskazuje na wspólne pochodzenie tych egzemplarzy.
- ✦ Odnowa cisa w badanych rezerwach wskazuje na jego zanikanie (zamieranie młodych i brak starszych siewek). Warunki siedliskowe mają wpływ na rozwój i odnowę cisa w rezerwach.

Literatura

- Chung M. G., Oh G. S., Chung J. M. 1999. Allozyme variation in Korean populations *Taxus cuspidata* (Taxaceae). Scandinavian Journal of Forest Research 14:103-110.
- Chybicki I. J., Oleksa A., Burezyk J. 2011. Increased inbreeding and strong kinship structure in *Taxus baccata* estimated from both AFLP and SSR data. Heredity 107: 589-600.
- Collins D., Mill R., Moller M. 2003. Species separation of *Taxus baccata*, *T. canadensis* and *T. cuspidata* (Taxaceae) and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data. American J. Bot. 90 (2): 175-182.
- Corradini P., Edelin C., Bruneau A., Bouchard A. 2002. Architectural and genotypic variation in the clonal shrub *Taxus canadensis* as determined from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism. Canadian J. Bot. 80: 205-219.
- González-Martínez S. C., Dubreuil M., Riba M., Vendramin G. G., Sebastiani F., Mayol M. 2010. Spatial genetic structure of *Taxus baccata* L. in the western Mediterranean Basin: Past and present limits to gene movement over a broad geographic scale. Molecular Phylogenetics and Evolution 55: 805-815.
- Hamrick J. L., Godt M. J. W., Sherman-Broyles S. L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests 6: 95-124.
- Hilfiker K., Holderegger R., Rotach P., Gugerli F. 2004. Dynamics of genetic variation in *Taxus baccata*: local versus regional perspectives. Canadian Journal of Botany 82 (2): 219-227.
- Iszkuło G., Boratyński A. 2006. Analysis of relationship between photosynthetic proton flux density and natural *Taxus baccata* seedlings occurrence. Acta Oecologia 29: 78-84.
- Król S. 1975. Zarys ekologii. W: Białobok S. [red.]. Nasze drzewa leśne. Tom 3. Cis pospolity (*Taxus baccata* L.). Instytut Dendrologii PAN w Kórniku. 78-103.
- Kruszelnicki J. 2001. *Taxus baccata* L. Cis pospolity. W: Kaźmierczak R., Zarzycki K. [red.]. 2001. Polska Czerwona Księga Roślin. Instytut Botaniki im. W. Szafera, Instytut Ochrony Przyrody, Kraków. 68-70.
- Lewandowski A., Burezyk J., Mejnartowicz L. 1995. Genetic structure of English yew (*Taxus baccata* L.) in the Wierchlas Reserve: implications for genetic conservation. For. Ecol. Manage. 73: 221-227.
- Li X. L., Yu X. M., Guo W. 2006. Genomic diversity within *Taxus cuspidata* var. *nana* revealed by random amplified polymorphic DNA markers. Russian J. Plant Physiol. 53: 684-688.
- Müller W. 1911. Flora von Pommern. Johs. Surmeisters, Stetin.
- Myking T., Vakkari P., Skroppa T. 2009. Genetic variation in northern marginal *Taxus baccata* L. populations. Implications for conservation. Forestry 82: 529-539.
- Namvar K., Spethmann W. 1986. Die Eibe (*Taxus baccata* L.). Allgemeine Forst-Zeitschrift 23: 568-571.

- Nawrocka-Grześkowiak U., Frydel K. 2009. Rozmnażanie cisa oraz możliwości jego restytucji w lasach na przykładzie Nadleśnictwa Kaliska. Zesz. Problemowe Post. Nauk. Roln. 540: 67-75.
- Petit R. J., Hampe A. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 37: 187-214.
- Rajewski M., Lange S., Hattemer H. H. 2000. Reproduktion bei der Generhaltung seltener Baumarten – das Beispiel der Eibe (*Taxus baccata* L.). For. Snow Landsc. Res. 75: 251-266.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 lipca 2004 r. w sprawie gatunków dziko występujących roślin objętych ochroną. 2004. Dz. U. Nr 168, poz. 1764.
- Scher S. 1996. Genetic structure of natural *Taxus* populations in western North America. W: Smith T. B., Wayne R. K. [red.]. Molecular Genetic Approaches in Conservation. Oxford University Press, New York. 424-441.
- Seneta W., Dolatowski J. 2012. Dendrologia. PWN, Warszawa. 26-30.
- Thomas P. A., Polwart A. 2003. *Taxus baccata* L. Journal of Ecology 9: 489-524.
- Zarek M. 2009. RAPD Analysis of Genetic Structure in Four Natural Populations of *Taxus baccata* from Southern Poland. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 56: 67-75.
- Zarządzenie nr 29 z 30 czerwca 2006 r. w sprawie wprowadzenia w jednostkach organizacyjnych Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasy Państwowe „Programu ochrony i restytucji cisa pospolitego (*Taxus baccata* L.) w Polsce”. 2006. ZG-710/Tb/06.