PRĄDNIK
PRACE I MATERIAŁY MUZEUM IM. PROF. WŁADYSŁAWA SZAFERA

Prądnik. Prace Muz. Szafera	**34**	089–106	**2024**

KATARZYNA BZDĘGA*, ALINA URBISZ, ANDRZEJ URBISZ, AGNIESZKA JANIAK, AGNIESZKA BRĄSZEWSKA, JADWIGA POJNAR

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, *e-mail: katarzyna.bzdega@us.edu.pl

STRUKTURA EKOLOGICZNA I GENETYCZNA IZOLOWANYCH POPULACJI OBUWIKA POSPOLITEGO (*CYPRIPEDIUM CALCEOLUS* L.) W ZBIOROWISKACH LEŚNYCH OJCOWSKIEGO PARKU NARODOWEGO (POŁUDNIOWA POLSKA)

Ecological and genetic structure of isolated populations of the Lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in forest communities of Ojców National Park (southern Poland)

Abstract. The article presents the ecological characteristics and genetic structure of two isolated populations of a rare and endangered lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Ojców National Park (ONP) forest communities. The main goal of the present study was to identify the patterns of population structure, genetic diversity, and connectivity of these local populations of *C. calceolus* in ONP. Five nuclear microsatellites and a fragment of cpDNA sequence were applied in the genetic diversity and spatial genetic structure study. Chromosome numbers were determined on twenty selected metaphase plates.

Key words: chromosome number, cpDNA, ecological structure, genetic variability, isolated populations, nuclear microsatellites, Orchidaceae

WSTĘP

Niewielka powierzchnia Ojcowskiego Parku Narodowego (OPN) powoduje, że populacje wielu występujących tu gatunków roślin są nieliczne i izolowane od zwartego zasięgu lub najbliższych stanowisk. Ponadto OPN to leśna wyspa roślinności w rejonie użytkowanym rolniczo, w związku z tym brak jest również połączeń leśnych między Parkiem a najbliższymi, sąsiednimi ostojami leśnymi. Liczne badania naukowe potwierdzają, że w małych, izolowanych populacjach najczęściej dochodzi do zubożenia ich pul genowych, mniejszej żywotności i w konsekwencji do wymierania. Są one również bardziej podatne na niekorzystne zjawiska losowe, które mogą prowadzić do ich eliminacji (Pullin, 2005; Myking i in., 2009; Babczyńska-Sendek & Sierka, 2018).

DOI: 10.5281/zenodo.14505025

Obuwik pospolity *Cypripedium calceolus* L. jest gatunkiem chronionym, zarówno przez prawo międzynarodowe: Dyrektywa Siedliskowa Załącznik II i IV, jak i prawo krajowe: ochrona gatunkowa ścisła, *Polska Czerwona Księga Roślin* – VU (Kaźmierczakowa i in., 2014), *Polska czerwona lista paprotników i roślin kwiatowych* – VU (Kaźmierczakowa i in., 2016), *Czerwona Księga Karpat Polskich* – EN (Mirek & Piękoś-Mirkowa, 2008). Na terenie OPN jest gatunkiem bardzo rzadkim. Występuje w zbiorowiskach leśnych Parku, na nielicznych stanowiskach w Dolinach Zachwytu i Sąspowskiej.

Zaplanowane badania ekologiczne i genetyczne populacji obuwika pospolitego na terenie Parku miały dać odpowiedź na pytania dotyczące stanu zachowania jego populacji i ustalenia czy izolacja jego stanowisk, na leśnej wyspie jaką jest OPN, wpłynęła na jej strukturę i zróżnicowanie genetyczne. W związku z tym przyjęto następujące cele: określenie struktury ekologicznej (1) i zmienności genetycznej izolowanych populacji obuwika pospolitego w zbiorowiskach leśnych OPN (2), ustalenie, czy populacje obuwika w OPN są zubożone genetycznie, a jeśli tak, to w jakim stopniu (3), ocena kondycji ekologicznej tego gatunku w OPN (4) oraz opracowanie planu ochrony obuwika w OPN (5).

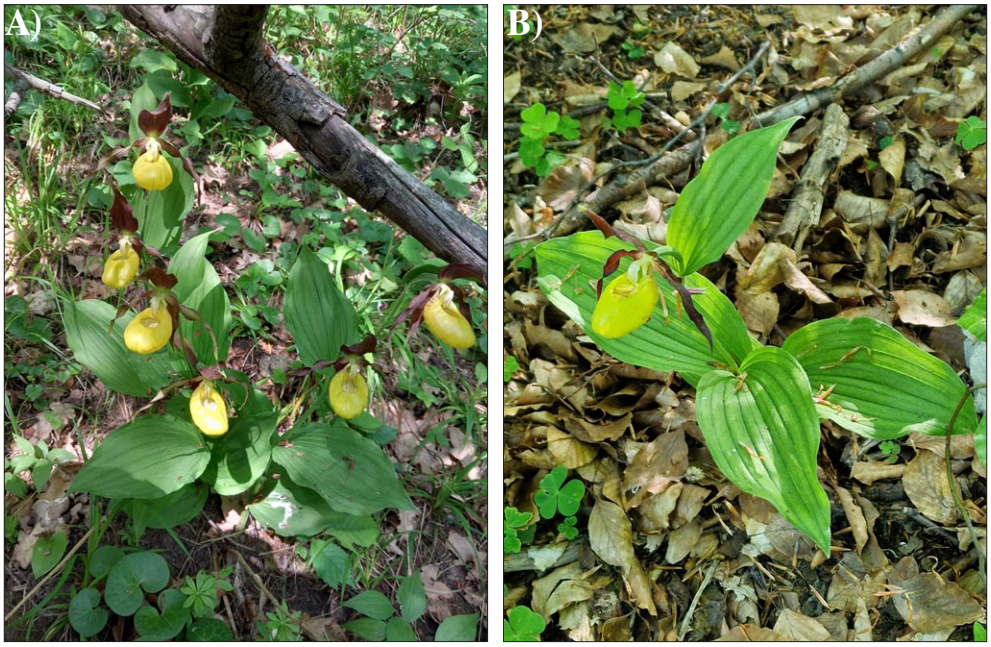
CHARAKTERYSTYKA BADANEGO GATUNKU

Cypripedium calceolus (ryc. 1) to roślina wieloletnia, tzw. geofit kłączowy z rodziny Orchidaceae Juss. Gatunek rozpoczyna wegetację w kwietniu, a kończy we wrześniu i październiku. Kwitnie od połowy maja do połowy lipca w zależności od położenia populacji w zasięgu geograficznym. W Polsce południowej kwitnienie rozpoczyna się w połowie maja, a na północy z 2 lub 3-tygodniowym opóźnieniem. Okres kwitnienia zależy także od warunków lokalnych, np. wysokości nad poziomem morza, ekspozycji, zwarcia drzew i krzewów (Kucharczyk, 2010).

Okazałe i pachnące kwiaty obuwika pospolitego wyrastają na szczycie pędu, zwykle pojedynczo, rzadziej po 2, bardzo rzadko – 3. Warżka o barwie cytrynowożółtej, rzadko zielonawożółtej lub białej, o krawędziach podwiniętych do wnętrza, osiąga do 30 mm długości, 20 mm szerokości i tyle samo wysokości. Z kolei płatki mają barwę czerwonobrunatną, u nasady są zielone, wewnątrz gładkie, a na zewnątrz owłosione. Owocem jest łukowato wygięta torebka o długości do 30 mm. Każda zawiera liczne (6000–17 000), drobne nasiona przenoszone przez wiatr. Ich rozsiewanie (anemochoria) trwa od września do października (Kull, 1999).

Liczba liści u obuwika pospolitego waha się od 2 do 5, zwykle 4 na pędach generatywnych. Mają one kształt jajowaty do szerokolancetowatego: 3–11 cm szerokości i 6–17 cm długości o ostrym zakończeniu, często na krawędziach fałdowane i podobnie jak pęd – krótko owłosione (Kucharczyk, 2010).

Kluczowe dla bytowania populacji obuwika w lasach (prześwietlone, ciepłolubne buczyny, grądy i dąbrowy), są warunki świetlne. Optymalne warunki dla obecności obuwika panują w lukach drzewostanu, tworzonych np. po wiatrołomach lub na wyciętych pasach bezleśnych tzw. liniach oddziałowych. Oprócz terenów leśnych obuwik zasiedla zbiorowiska w strefie ekotonu, między lasem a murawami oraz ciepłolubne zarośla i okrajki, jak również otwarte murawy kserotermiczne (Kucharczyk, 2010). Uwzględniając aspekty prawne, gatunek ten w Polsce objęty jest ochroną ścisłą (Rozporządzenie…, 2014).



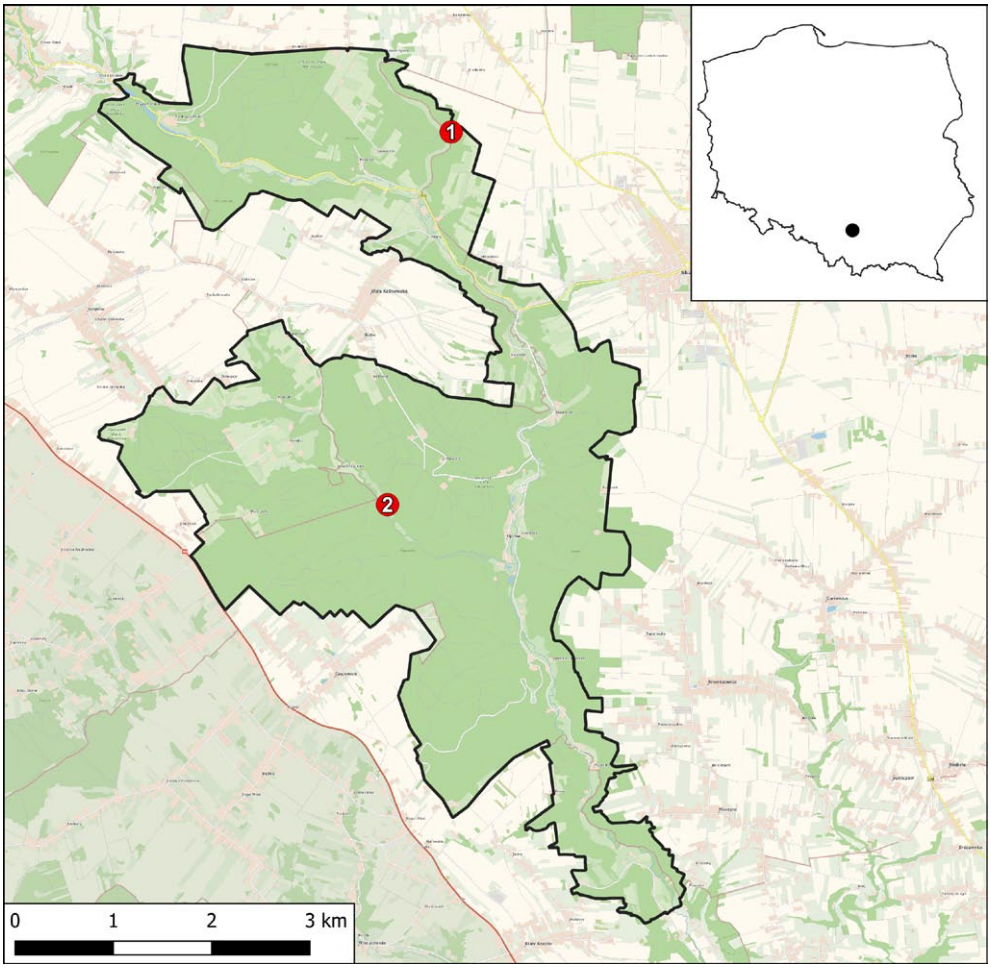
Ryc. 1. *Cypripedium calceolus* L.: A – pojedyncza kępa, Fot. Al. Urbisz; B – pojedynczy osobnik. Fot. K. Bzdęga

Fig. 1. *Cypripedium calceolus* L.: A – a single clump, Photo Al. Urbisz; B – a single individual. Photo K. Bzdęga

MATERIAŁY I METODY

Badania *Cypripedium calceolus* przeprowadzono na terenie OPN w 2023 r. na dwóch stanowiskach, tj. w Dolinie Zachwytu i w Dolinie Sąspowskiej (ryc. 2), gdzie gatunek występuje na zalesionych zboczach. W Dolinie Zachwytu jego stanowisko jest zlokalizowane po wschodniej stronie w środkowej części doliny, w górnej i środkowej partii zbocza. Od północy graniczy z użytkami rolnymi. Natomiast w Dolinie Sąspowskiej występuje w okolicach Złotej Góry, na północny zachód od Skały Szalej, w środkowej części zbocza.

Monitoring analizowanego gatunku wykonano zgodnie z metodyką Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska (GIOŚ), opisaną w przewodniku metodycznym monitoringu (Perzanowska i in., 2015). Zakres obserwacji na stanowiskach monitoringowych wynikał z metodyki opracowanej dla obuwika pospolitego. Badania/obserwacje terenowe nie wymagały specjalistycznego sprzętu. Do pomiaru grubości wojłoku (martwej materii organicznej) i wysokości runi używano metalowej miary zwijanej. Została ona zastosowana także do pomiarów biometrycznych obejmujących wysokości pędów, długości i szerokości liści wybranych losowo osobników obuwika. Dokumentację fotograficzną wykonano cyfrowymi aparatami (Galaxy S22 Ultra, Samsung Galaxy A13). Nazewnictwo gatunków przyjęto za Mirek i in. (2020), a jednostek syntaksonomicznych wg Matuszkiewicza (2024).



Ryc. 2. Wytypowane do badań stanowiska obuwika pospolitego (*Cypripedium calceolus* L.) na terenie Ojcowskiego Parku Narodowego: 1 – Dolina Zachwytu, 2 – Dolina Sąspowska

Fig. 2. Localities selected for research of the Lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Ojców National Park: 1 – Zachwytu Valley, 2 – Sąspowska Valley

Analiza zmienności i struktura genetyczna populacji

Do analizy zmienności genetycznej za pomocą markerów molekularnych pobrano liście obuwika pospolitego z 43 osobników z populacji zlokalizowanej w Dolinie Zachwytu oraz z 20 osobników z populacji w Dolinie Sąspowskiej. Pobrany materiał wysuszono za pomocą żelu krzemionkowego i wykorzystano do izolacji DNA metodą mikro-CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Dla każdego osobnika wykonano po dwie izolacje DNA, które stanowiły powtórzenia techniczne.

Tabela 1. Charakterystyka loci SSR wykorzystanych w analizie populacji *Cypripedium calceolus* L. z Ojcowskiego Parku Narodowego

Table 1. SSR loci used in the analysis of the *Cypripedium calceolus* L. population from Ojców National Park

Nazwa locus Locus name	Sekwencje pary starterów Primer sequences	Motyw powtarzalny Repetitive motif
Ccal_7	TAAGCACTTCTTGGGAGGCA	AGT
	GAGGTTGAGCACAAGAAAGAAA	
Ccal_25	CAGCATTTTGCTCAATGTCTTT	ATC
	CAGATAATGGCCCTTTGGTC	
Ccal_34	CATGGAAGGGAATAACATCCT	AT
	TGCAATTCCATGTACTTGTTCATTA	
Ccal_49	TGGAAGGGTCATGTTACTAGCAG	AAG
	TGGTGATGACACAACTAACTCCA	
Ccal_50	GAGAAGGGATTCAATAGGTTTGG	AAG
	AAGTTCCTTCTCATTTCTAGCTCTC	

Wszystkie izolaty były dobrej jakości i charakteryzowały się wysoką koncentracją. W analizach molekularnych wykorzystano pięć loci mikrosatelitarnych (*Simple Sequence Repeats*, SSR; tab. 1), które według wcześniejszych danych literaturowych charakteryzowały się wysokim polimorfizmem wśród osobników *Cypripedium calceolus* reprezentujących populacje z Pomorza Gdańskiego (Minasiewicz & Znaniecka, 2014).

Dodatkowo, wykonano analizę fragmentu chloroplastowego DNA (cpDNA) reprezentującego rejon międzygenowy accD-psaI, wykorzystując startery zawarte w publikacji Small i in. (1998). Loci SSR poddano amplifikacji z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanego startera „forward", a produkty amplifikacji rozdzielano w żelach poliakrylamidowych z użyciem sekwenatora Li-Cor. Fragment cpDNA również amplifikowano, a następnie poddano sekwencjonowaniu metodą Sangera i elektroforezie z użyciem sekwenatora ABI 3730xl.

Uzyskane wyniki analizowano z wykorzystaniem programu GenAlEx (Peakall & Smouse, 2012), oceniając liczbę alleli SSR (Na), efektywną liczbę alleli (Ne), obserwowaną (Ho) i spodziewaną heterozygotyczność (He), współczynnik wsobności (Fis), współczynnik utrwalenia (Fst), współczynnik przepływu genów (Nm) oraz proporcje i dystrybucję zmienności w badanych populacjach z wykorzystaniem analizy AMOVA. Dodatkowo, dla loci SSR obliczono indeks zmienności Gini-Simpsona (GS) wg wzoru: $GS = 1 - (\Sigma ni(ni-1) / N(N-1))$, gdzie ni oznacza liczbę osobników reprezentujących określony genotyp, a N, całkowitą liczbę analizowanych osobników.

Analiza liczby chromosomów

Analizę liczby chromosomów przeprowadzono z tkanki młodych liści. Materiał roślinny traktowano przez 4h w temperaturze pokojowej roztworem 8-hydroksychinoliny, w celu uzyskania skondensowanych i rozłożonych chromosomów w obrębie płytek metafazowych, następnie utrwalono w mieszaninie metanolu i kwasu octowego (w stosunku 3:1) przez noc. Izolację jąder komórkowych oraz płytek metafazowych wykonano według metody użytej przez Kolano i in. (2008), z drobnymi modyfikacjami. Preparaty cytogenetyczne

wybarwiono barwnikiem fluorescencyjnym DAPI (DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, cat. no. D-9564) z medium zamykającym Vectashield (Vector Laboratories, cat. no. H-1000) w stosunku 1:15. Wybarwione preparaty analizowano z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (Olympus FV1000) według Brąszewska-Zalewska i in. (2010). Analizę i obróbkę obrazu mikroskopowego przeprowadzono z użyciem programu ImageJ (Fiji), według Wolny i in. (2014). Analizy wykonano na fragmentach 2–4 liści pochodzących od 4 osobników.

WYNIKI

Monitoring środowiskowy

Opis siedliska, wielkość populacji oraz roślinność na stanowisku w Dolinie Zachwytu

Powierzchnię siedliska w Dolinie Zachwytu, zajętą przez obuwika pospolitego oceniono na ok. 5 ha. Natomiast powierzchnię potencjalnego siedliska dla gatunku oszacowano na około 50 ha. Stopień fragmentacji siedliska określono jako mały. Jego ocienienie oscylowało od 70–80% na wierzchowinie w pobliżu granicy lasu, do ok. 50% w centralnej części stoku, za wyjątkiem miejsc, w których prowadzone są przez OPN prześwietlenia drzewostanu, polegające na wycince leszczyny (ok. 30%). W obrębie siedliska nie stwierdzono obecności ekspansywnych, jak też inwazyjnych gatunków roślin (ryc. 3).



Ryc. 3. Siedlisko z *Cypripedium calceolus* L. w Dolinie Zachwytu Ojcowskiego Parku Narodowego. Fot. Al. Urbisz

Fig. 3. A habitat with *Cypripedium calceolus* L. in Zachwytu Valley, Ojców National Park. Photo by Al. Urbisz

Wysokość runi na tym stanowisku wahała się od 5 do 30 cm. Natomiast grubość zalegającej martwej materii organicznej (wojłoku) oscylowała od 0 do 20 cm i była zmienna w obrębie stanowiska. Wojłok stanowiły przede wszystkim liście buka *Fagus sylvatica*, graba *Carpinus betulus*, leszczyny *Corylus avellana* i jawora *Acer pseudoplatanus*. Na opisywanym stanowisku, powierzchnia odkrytej gleby stanowiącej potencjalne miejsce do kiełkowania nasion obuwika pospolitego, wynosiła ok. 15%. Nie stwierdzono negatywnych wpływów z otoczenia; zaobserwowano jedynie niezbyt liczne występowanie podagrycznika pospolitego *Aegopodium podagraria* na wierzchowinie stoku, przy granicy lasu.

Populację *Cypripedium calceolus* w Dolinie Zachwytu stanowiło 238 pędów, spośród których część tworzyła kępy. Ogółem stwierdzono 30 kęp tworzonych przez mniej niż 5 pędów, najczęściej 2–3. W zależności od miejsca występowania obuwika na analizowanym stanowisku, jego pędy rozmieszczone były pojedynczo lub w kępach. Udział pędów generatywnych obuwika oszacowano na 106 (w tym 15 dwukwiatowych), co stanowi ok. 45% udziału w populacji. Z kolei liczba pędów wegetatywnych obuwika wyniosła 132, co stanowi ok. 55% ich udział w populacji gatunku. Uśrednione wyniki pomiarów biometrycznych pędów i liści dla 15 losowo wybranych osobników obuwika pospolitego na badanym stanowisku były następujące: średnia wysokość pędu – 38,3 cm, średnia liczba liści – 4,5 cm, średnia długość liści – 14,1 cm i średnia szerokość liści – 7,9 cm. Na podstawie liczby zawiązanych torebek nasiennych stwierdzono, że efektywność zapylania jest mała; zaobserwowano jedynie 21 pędów z jedną torebką, co stanowi 19,8% osobników kwitnących. W Dolinie Zachwytu nie stwierdzono obecności siewek obuwika pospolitego. Stan zdrowotny populacji badanego gatunku oceniono jako właściwy, ponieważ zaobserwowano jedynie pojedyncze pędy obuwika uszkodzone przez ślimaki lub gąsienice owadów i nieliczne zgryzione przez inne zwierzęta.

Obuwik występuje tu na stromym zboczu, w lesie grądowym *Carpinion betuli* ze znacznym udziałem buka w drzewostanie, na powierzchni około 5 ha. W drzewostanie dominują: buk *Fagus sylvatica*, grab *Carpinus betulus*, jawor *Acer pseudoplatanus* oraz leszczyna *Corylus avellana*. Podszyt tworzą głównie leszczyna i grab. W runie najczęściej występują: turzyca leśna *Carex sylvatica*, kopytnik pospolity *Asarum europaeum*, konwalijka dwulistna *Maianthemum bifolium*, miodunka ćma *Pulmonaria obscura*, kłosownica leśna *Brachypodium sylvaticum*, konwalia majowa *Convallaria majalis*, częściowo chroniony miodownik melisowaty *Melittis melissophyllum*, gajowiec żółty *Galeobdolon luteum*, groszek wiosenny *Lathyrus vernus* i przytulia wonna *Galium odoratum*. Z gatunków chronionych rośnie tu także buławnik wielkokwiatowy *Cephalanthera damasonium* oraz wawrzynek wilczełyko *Daphne mezereum*. W warstwie mszystej występują rokiet cyprysowaty *Hypnum cupressiforme* i wiewiórecznik osinowy *Sciuro-hypnum populeum*.

Opis siedliska, wielkość populacji oraz roślinność na stanowisku w Dolinie Sąspowskiej

Powierzchnię siedliska na stanowisku w Dolinie Sąspowskiej, porośniętą przez obuwika pospolitego oceniono na ok. 0,4 ha. Z kolei powierzchnię potencjalnego siedliska dla gatunku, oszacowano na około 30–40 ha. Stopień fragmentacji siedliska określono jako mały. Jego ocienienie oceniono na 80–90%. W obrębie siedliska nie stwierdzono obecności ekspansywnych, jak też inwazyjnych gatunków roślin. Wysokość runi na stanowisku wahała się od 5 do 30 cm. Grubość zalegającej martwej materii organicznej (wojłoku) oscylowała od 0 do 20 cm i była zmienna w obrębie stanowiska. Wojłok stanowiły przede wszystkim liście buka *Fagus sylvatica*. Na opisywanym stanowisku, powierzchnia odkrytej gleby stanowiącej potencjalne miejsce do kiełkowania nasion obuwika pospolitego, wynosiła



Ryc. 4. Siedlisko występowania *Cypripedium calceolus* L. w Dolinie Sąspowskiej Ojcowskiego Parku Narodowego. Fot. K. Bzdęga.

Fig. 4. The habitat of *Cypripedium calceolus* L. in Sąspowska Valley, Ojców National Park. Photo by K. Bzdęga.

ok. 15%. Za negatywny wpływ z otoczenia dla siedliska w Dolinie Sąspowskiej, należy uznać zarastanie siedliska przez podrost buka (ryc. 4), co przyczynia się do zmniejszania liczby kwitnących pędów obuwika, a w dalszej perspektywie może doprowadzić do zaniku jego populacji w omawianym miejscu.

Populację *Cypripedium calceolus* w Dolinie Sąspowskiej, stanowiły jedynie 33 pędy rosnące w siedlisku pojedynczo i w dużym rozproszeniu. Nie tworzyły one żadnych kęp. Liczba pędów generatywnych obuwika pospolitego wyniosła 7 (w tym 1 dwukwiatowy), co stanowi ok. 21% udziału w całej populacji. Z kolei liczba pędów wegetatywnych obuwika była równa 26, co stanowi prawie 79% ich udziału w populacji gatunku. Uśrednione wyniki pomiarów biometrycznych pędów i liści dla 15 losowo wybranych osobników obuwika pospolitego na badanym stanowisku były następujące: średnia wysokość pędu – 31,1 cm, średnia liczba liści – 4,7 cm, średnia długość liści – 10,8 cm i średnia szerokość liści – 6,5 cm. Na podstawie liczby zawiązanych torebek nasiennych stwierdzono, że efektywność zapylania obuwika pospolitego jest bardzo mała; odnotowano tylko 1 pęd z jedną torebką, co stanowi 14,3% osobników kwitnących. Na stanowisku w Dolinie Sąspowskiej nie stwierdzono obecności siewek obuwika pospolitego. Stan zdrowotny populacji badanego gatunku oceniono jako właściwy, ponieważ zaobserwowano jedynie pojedyncze pędy obuwika uszkodzone przez ślimaki lub gąsienice owadów i nieliczne zgryzione przez zwierzęta.

Obuwik rośnie tu na zboczu, w lesie liściastym o charakterze buczyny *Fagion sylvaticae* na powierzchni około 0,4 ha. Zarówno w drzewostanie jak i w podszycie dominuje buk *Fagus sylvatica*. W runie najczęściej występują: turzyca leśna *Carex sylvatica*, kopytnik pospolity *Asarum europaeum*, jarzmianka większa *Astrantia major*, przylaszczka pospolita *Hepatica nobilis*, zawilec gajowy *Anemone nemorosa*, konwalijka dwulistna *Maianthemum bifolium*, nerecznica samcza *Dryopteris filix-mas* i częściowo chroniony gnieźnik leśny *Neottia nidus-avis*. Z innych gatunków chronionych występuje tu również miodownik melisowaty *Melittis melissophyllum* oraz lilia złotogłów *Lilium martagon*. Warstwę mszystą tworzą: złotowłos strojny *Polytrichastrum formosum*, czterozęb przeźroczysty *Tetraphis pellucida*, krótkoszek aksamitny *Brachytecium velutinum* i skosatka parzochowata *Plagiochila porelloides*.

Wyniki badań genetycznych

Badania zmienności genetycznej dwóch populacji obuwika oparto o system markerów typu SSR oraz analizę rejonu międzygenowego accD-psaI w chloroplastowym DNA (cpDNA). Spośród pięciu loci mikrosatelitarnych uwzględnionych w analizie, dwa: Ccal_7 oraz Ccal_34 okazały się monomorficzne w obu badanych populacjach obuwika pospolitego. W analizie pozostałych trzech loci dla części osobników nie uzyskano produktów amplifikacji. Świadczy to najprawdopodobniej o zmienności w obrębie miejsc przyłączania starterów lub na poziomie pojedynczych nukleotydów, albo dotyczącej insercji lub delecji większego fragmentu DNA. Ze względu na to, że brak amplifikacji, skutkujący tzw. zerowym allelem, może zaburzać późniejszą analizę wyników, osobniki obuwika, dla których nie uzyskano produktów amplifikacji usunięto z analizy, redukując ostateczną ich liczbę do 12 osobników z Doliny Zachwytu oraz 15 osobników z Doliny Sąspowskiej (tab. 2).

Przeprowadzona analiza zmienności genetycznej markerów SSR wykazała duże zróżnicowanie obu populacji obuwika. Zidentyfikowano po pięć alleli w obrębie loci Ccal_25 i Ccal_50 oraz 7 alleli w locus Ccal_49 w populacji z Doliny Zachwytu oraz odpowiednio 8, 3 i 6 alleli w populacji z Doliny Sąspowskiej. W każdej z populacji wykryto także obecność czterech alleli prywatnych, występujących unikalnie tylko w jednej z nich. Z kolei indeks zmienności Gini-Simpsona wyniósł 1 oraz 0,96, odpowiednio dla populacji z Doliny Zachwytu i z Doliny Sąspowskiej, co świadczy o braku zauważanej klonalności analizowanych populacji.

Tabela 2. Proporcje osobników obuwika pospolitego z allelami zerowymi dla polimorficznych loci SSR

DNA total – liczba osobników poddanych izolacji DNA; Ccal_25 null, Ccal_49 null, Ccal_50 null – liczba osobników z allelami zerowymi dla danego locus; N – ostateczna liczba osobników poddanych analizie

Table 2. Proportions of lady's slipper orchid individuals with null alleles at polymorphic SSR loci

DNA total – number of individuals subjected to DNA extraction; Ccal_25 null, Ccal_49 null, Ccal_50 null – number of individuals with null alleles for a given locus; N – final number of individuals subjected to analysis

Populacja Population	DNA total	Ccal_25 null	Ccal_49 null	Ccal_50 null	N
Dolina Zachwytu Zachwytu Valley	43	15	31	31	12
Dolina Sąspowska Sąspowska Valley	20	5	6	5	15

Tabela 3. Liczba alleli SSR (Na), efektywna liczba alleli (Ne) obserwowana (Ho) i spodziewana heterozygotyczność (He) dla poszczególnych loci SSR w badanych populacjach obuwika pospolitego

Table 3. Number of SSR alleles (Na), effective number of alleles (Ne), and observed (Ho) and expected (He) heterozygosity for individual SSR loci in the studied populations of the lady's slipper orchid

Populacja Population	Locus SSR	N	Na	Ne	Ho	He
Dolina Zachwytu / Zachwytu Valley	Ccal_25	12	5	3,646	0,5	0,726
	Ccal_49	12	7	5,143	0,917	0,806
	Ccal_50	12	5	3,349	0,75	0,701
Średnia ± SD Average ± SD	12±0,000	5,667±0,667	4,046±0,555	0,722±0,121	0,744±0,031	12±0,000
Dolina Sąspowska / Sąspowska Valley	Ccal_25	15	8	5,696	0,867	0,824
	Ccal_49	14	6	4,455	1	0,776
	Ccal_50	15	3	2,174	0,533	0,54
Średnia ± SD Average ± SD	14±0,333	5,667±1,453	4,108±1,031	0,800±0,139	0,713±0,088	14±0,333

Poziom obserwowanej heterozygotyczności dla każdego z przeanalizowanych loci wśród osobników z Doliny Zachwytu wahał się od 0,5 do 0,917, a w przypadku populacji z Doliny Zachwytu mieścił się w zakresie od 0,533 do 1. Nie zaobserwowano odchyleń żadnego z locus od równowagi Herdy'ego-Weinberga (Edwards, 2008). Uśrednione wartości obserwowanej heterozygotyczności dla obu populacji były zbliżone i wyniosły 0,722 oraz 0,800 odpowiednio dla populacji z Doliny Zachwytu oraz populacji z Doliny Sąspowskiej (tab. 3).

Są to wartości wysokie, wskazujące na dużą zmienność genetyczną wśród osobników z badanych populacji i świadczące o ich swobodnym krzyżowaniu się. Co ciekawe, średnia wartość obserwowanej heterozygotyczności w populacji z Doliny Zachwytu jest bardzo zbliżona do heterozygotyczności spodziewanej, a w przypadku populacji z Doliny Sąspowskiej jest od niej wyższa. Może to sugerować efekt przełamania izolacji i napływ nowych alleli z innych populacji.

Tabela 4. Współczynniki wsobności (Fis), utrwalenia (Fst) oraz przepływu genów (Nm) dla badanych loci SSR w obrębie obu populacji obuwika pospolitego

Table 4. Inbreeding (Fis), fixation (Fst) and gene flow (Nm) coefficients for the studied SSR loci within both lady's slipper orchid populations

Locus	Fis	Fst	Nm
Ccal_25	0,118	0,04	6,072
Ccal_49	-0,212	0,062	3,754
Ccal_50	-0,034	0,02	12,345
Średnia / average	-0,043	0,041	7,39
SD	0,096	0,012	2,566

Tabela 5. Wyniki analizy AMOVA dla loci SSR w populacjach obuwika pospolitego z Doliny Zachwytu i Doliny Sąspowskiej

df – stopnie swobody, SS – suma kwadratów, MS – średnia kwadratów, Var – oszacowana wariancja, % – procent wyjaśnionej zmienności

Table 5. Results of AMOVA analysis for SSR loci in the lady's slipper orchid populations from Zachwyt Valley and Sąspowska Valley

df – degrees of freedom, SS – sum of squares, MS – mean of squares, Var – estimated variance, % – percentage of explained variation

Źródło zmienności Source of variation	**df**	**SS**	**MS**	**Var**	**%**
Między populacjami / Between populations	1	2,519	2,519	0,051	4%
Między osobnikami / Between individuals	25	28,758	1,15	0,01	1%
Wewnątrz populacji / Inside the population	27	30,5	1,13	1,13	95%
Ogółem / Total	53	61,778	-	1,191	100%

Powyższa obserwacja została także poparta parametrami statystyki F oraz indeksem przepływu genów (tab. 4).

Uzyskane wartości współczynnika wsobności Fis określającego prawdopodobieństwo homozygotyczności osiągniętej dzięki wspólnemu pochodzeniu osobników mieszczą się w granicach wartości zerowej, co świadczy o losowym krzyżowaniu się osobników. Podobnie, średni współczynnik utrwalenia Fst osiągnął dla badanych populacji wartość 0,041, co wskazuje na brak wyraźnego zróżnicowania między nimi. Ponadto uzyskany współczynnik przepływu genów (Nm) jest bardzo wysoki, średnio 7,39, co może sugerować możliwość przepływu alleli między badanymi populacjami lub też napływu nowych alleli do analizowanych populacji z innych stanowisk obuwika.

Przeprowadzono także analizę wariancji molekularnej (AMOVA), aby określić najbardziej istotne źródło zmienności w badanych populacjach. Stwierdzono, że 95% obserwowanej zmienności wynika ze zróżnicowania osobników w obrębie populacji, a tylko 4% zmienności opisuje różnice pomiędzy populacjami (tab. 5).

Jest to wynik zgodny z parametrem Fst sugerującym znaczne podobieństwo między populacjami z obu dolin.

Analizę zmienności opartą o jądrowe loci mikrosatelitarne uzupełniono o przetestowanie zmienności w obrębie rejonu międzygenowego w genomie chloroplastowym obejmującym odcinek accD-PsaI. W tym przypadku analizą objęto 33 osobniki populacji z Doliny Zachwytu oraz 14 osobników z Doliny Sąspowskiej. Sekwencjonowanie zamplifikowanego fragmentu dla każdego z badanych osobników pozwoliło na uzyskanie dobrej jakości sekwencji o średniej długości około 550 pz. W jej obrębie wykryto ogółem 33 pozycje polimorficzne, w tym 31 polimorfizmów typu SNP, jeden blok haplotypowy o długości 30 nukleotydów, występujący w dwóch wariantach określonych jako Hap1 i Hap2 oraz jeden większy indel. Co istotne, wszystkie z tych pozycji komponowały się

Tabela 6. Zbiorcza sekwencja reprezentująca wykryte pozycje polimorficzne w obrębie fragmentu locus accD-psaI w chloroplastowym DNA

Table 6. Collective sequence representing detected polymorphic positions within a fragment of the accD-psaI locus in chloroplast DNA

Nazwa / Name	Sekwencja / Sequence
Blok haplotypowy 1 / Haplotype block 1	GACCGATTAA-DEL88-GATGGGAC-ATGTCGTCGC-Hap1-TG
Blok haplotypowy 2 / Haplotype block 2	CGATCGGACG-INS88-ATATTACAACGAAAACGAA-Hap2-CA

Tabela 7. Liczba alleli (Na) oraz efektywna liczba alleli (Ne) i współczynnik zmienności (h) w chloroplastowym locus accD-psaI w badanych populacjach obuwika pospolitego

Table 7. The number of alleles (Na), the effective number of alleles (Ne), and the coefficient of variation (h) in the chloroplast locus accD-psaI in the studied populations of the lady's slipper orchid

Populacja / Population	N	Na	Ne	h
Dolina Zachwytu / Zachwytu Valley	33	2	1,502	0,334
Dolina Sąspowska / Sąspowska Valley	14	2	1,849	0,459

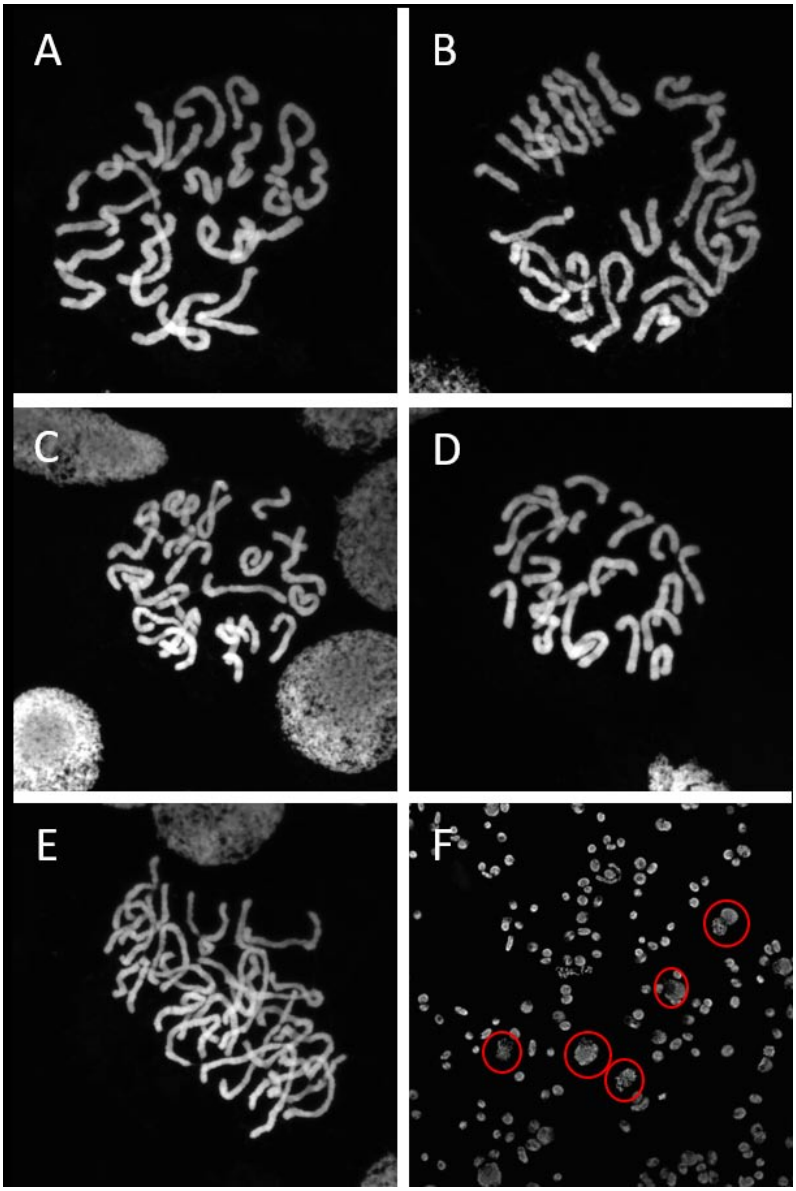
w dwa duże bloki haplotypowe, które można zinterpretować jako dwa odrębne allele reprezentujące zmienność badanych populacji na poziomie analizowanego fragmentu chloroplastowego DNA (tab. 6).

W przypadku Doliny Zachwytu 26 osobników posiadała blok typu 1, a siedem osobników miało blok typu 2. Wśród osobników z Doliny Sąspowskiej przeważał blok typu 2, który posiadało dziewieć osobników spośród 14 poddanych analizie.

Proporcje w występowaniu wspomnianych bloków haplotypowych przekładają się na nieco wyższy poziom zmienności obserwowany dla badanego locus cpDNA w obrębie populacji z Doliny Sąspowskiej, reprezentowany efektywną liczbą alleli (Ne) oraz współczynnikiem zmienności (h; tab. 7).

Wyniki badań cytogenetycznych

Analiza liczby chromosomów została przeprowadzona na średnio 20 płytkach metafazowych na osobnika. Liczbę chromosomów określono na 2n=22 (ryc. 6 A–D). Otrzymane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują, że u *Cypripedium calceolus* liczba chromosomów jest równa 2n=20 lub 2n=22 (Kull, 1999; Leitch i in., 2009). W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano również płytki i jądra poliploidalne (ryc. 6 E–F).



Ryc. 6. Płytki metafazowe obrazujące liczbę chromosomów u *Cypripedium calceolus* L. z populacji w Ojcowskim Parku Narodowym

A–D 2n=22, E–-F 2n>22. Barwienie DAPI, czerwonym kolorem oznaczono płytki i jądra poliploidalne (F). Os. 1 – A, Os. 2 – B, Os. 3 – C, Os. 4 – D.

Fig. 6. Metaphase plates representing the number of chromosomes in *Cypripedium calceolus* L. from the population in Ojców National Park

A–D 2n=22, E–F 2n>22. DAPI staining, red colour indicates polyploid plates and nuclei (F). Ind. 1 – A, Ind. 2 – B, Ind. 3 – C, Ind. 4 – D.

DYSKUSJA

Badania genetyczne

Przeprowadzone analizy oparte o markery SSR oraz rejon accD-psaI cpDNA wśród osobników z dwóch populacji obuwika pospolitego zlokalizowanych w obrębie OPN wskazały na istnienie wysokiego poziomu zmienności genetycznej w obrębie obu populacji. Obserwowana heterozygotyczność wynosiła odpowiednio 0,722 oraz 0,8 dla populacji z Doliny Zachwytu i Doliny Sąspowskiej. Jest to poziom wyższy niż wykryty za pomocą analogicznych markerów DNA dla populacji wstępujących na Pojezierzu Gdańskim, wśród których obserwowany poziom heterozygotyczności mieścił się w zakresie od 0,077 do 0,612 (Minasiewicz i in., 2018). Również niższy poziom heterozygotyczności zaobserwowano w populacjach obuwika w Biebrzańskim Parku Narodowym, w zakresie 0,175 – 0,181, przy czym badania zmienności w tych populacjach oparto o markery allozymowe (Brzosko i in., 2002). Wysoka zmienność populacji z OPN może świadczyć o ich dobrej kondycji i możliwości losowego krzyżowania się osobników. Fakt ten poparty jest także zgodnością zaobserwowanej częstotliwości alleli z prawem Hardy'ego-Weinberga, co dowodzi, że analizowane populacje znajdują się w równowadze genetycznej. Dodatkowo, na podstawie analizy loci SSR stwierdzono, że każdy z osobników z Doliny Zachwytu reprezentował unikalny genotyp. Z kolei prawdopodobieństwo, że losowo wybrany osobnik z Doliny Sąspowskiej będzie należał do innego genotypu wynosiło 0,96, co również świadczy o niemal całkowitym braku udziału rozmnażania wegetatywnego w tej populacji. Należy jednak podkreślić, że przedstawioną analizę oparto wyłącznie o trzy loci SSR. Co więcej, dla stosunkowo dużej frakcji osobników, które pobrano do analiz, nie uzyskano produktów amplifikacji, dlatego też konieczne będzie przebadanie dodatkowych loci SSR, w celu prawidłowej oceny poziomu klonalności w populacjach z OPN.

Ciekawym wynikiem jest natomiast występowanie nieco wyższej zmienności w obrębie populacji z Doliny Sąspowskiej w porównaniu do osobników z Doliny Zachwytu, szczególnie w świetle obserwacji związanych z większym udziałem gęstego podrostu buka, który powoduje ocienienie tego stanowiska. To niekorzystne dla populacji obuwika zjawisko sukcesji, wydaje się nie mieć w chwili obecnej negatywnego wpływu na ograniczenie zmienności genetycznej tej populacji. Może ono jednak negatywnie wpływać na jej zmienność w przyszłości.

Rozkład obserwowanej w niniejszym badaniu zmienności genetycznej w analizowanych populacjach obuwika pokazuje, że wynika ona przede wszystkim ze zmienności wewnątrzpopulacyjnej. Tylko niewielka część zmienności pochodzi ze zróżnicowania między badanymi populacjami (por. tab. 5). Wynik ten jest spójny z wartością parametru Nm, który można ogólnie opisać jako przepływ genów między populacjami, który dla populacji z OPN wynosił średnio 7,39. Otwartym pozostaje pytanie, czy współczynnik ten obrazuje obecnie występującą wymianę alleli między badanymi populacjami, co prawdopodobnie odzwierciedla przepływ genów, który miał miejsce w przeszłości tych populacji. Podobną tendencję wykryto wśród populacji z Biebrzańskiego Parku Narodowego, gdzie również zróżnicowanie wewnątrzpopulacyjne było wyższe niż obserwowane między populacjami, z dużą wartością współczynnika przepływu genów (Brzosko i in., 2002). Nieco inaczej wyglądała dystrybucja zmienności wśród populacji z Pomorza Gdańskiego, gdzie wskazano na istnienie większej izolacji między nimi, a co za tym idzie na wyższe zagrożenie wyginięciem (Minasiewicz i in., 2018).

Podsumowując, przeprowadzone analizy świadczą o żywotności i dużym zróżnicowaniu genetycznym badanych populacji obuwika w OPN, wskazując na dobrą perspektywę utrzymania i być może powiększania się ich stanowisk.

Opis ewentualnych zagrożeń i możliwych działań ochronnych dla gatunku

Podstawowym zagrożeniem dla obuwika jest sukcesja leśno-zaroślowa ,wskutek której szybko następuje nietolerowane przez ten gatunek ocienienie stanowiska na poziomie 60-70% (Leśniański i in., 2022). Wówczas do utrzymania gatunku konieczne jest stosowanie regularnych zabiegów usuwania podrostu drzew i krzewów. Do innych zagrożeń należy, m.in. możliwość zniszczenia populacji w wyniku prac leśnych, które powinny być prowadzone w sposób niezagrażający stanowiskom.

Na stanowiskach w Dolinie Zachwytu i Dolinie Sąspowskiej w OPN perspektywy ochrony populacji *Cypripedium calceolus* można uznać za pozytywne. Populacje tego gatunku nie są zagrożone w wyniku działalności ludzkiej. Jedynie na stanowisku w Dolinie Sąspowskiej, ocena może być nieco obniżona ze względu na postępujące procesy sukcesji leśnej, tj. gęsty podrost buka, który powoduje ocienienie. Wykonywanie działań ochronnych przez służby OPN nie jest jednak możliwe na tym stanowisku ze względu na jego lokalizację w strefie ochrony ścisłej. W tym przypadku jedynie naturalne losowe zdarzenia (np. wiatrołomy, nawalne deszcze) mogą prowadzić do prześwietlenia siedliska poprzez stopniowe zmniejszenie zwarcia buka.

Na stanowisku w Dolinie Zachwytu, gdzie prowadzone są zabiegi prześwietlania drzewostanu polegające na wycinaniu nadmiernie rozrastającej się leszczyny, kondycja obuwika jest lepsza; gatunek występuje tu liczniej, a rośliny zawiązują więcej kwiatów i torebek nasiennych. Zabiegi wykonywane są prawidłowo i powinny być kontynuowane w kolejnych latach przez służby Parku.

Czynna ochrona populacji obuwika i zachowanie stanowisk tego gatunku są ujęte w Planie Ochrony OPN (Rozprządzenie..., 2021).

Wskazania do przyszłych prac monitoringowych z uwzględnieniem częstotliwości monitoringu

W celu ustalenia zmian stanu ochrony obuwika pospolitego oraz określenia dynamiki populacji gatunku na terenie OPN, zaleca się prowadzenie monitoringu na wskazanych stanowiskach (Dolina Zachwytu i Dolina Sąspowska) co roku przez kolejne 5 lat (ze względu na naturalne fluktuacje liczebności pędów), a następnie w powtórzeniach co 3–5 lat.

Oba stanowiska obuwika pospolitego różnią się, m.in. liczebnością osobników, a także posiadają inny reżim ochronny. Stwarza to niepowtarzalną możliwość obserwacji kondycji obu populacji obuwika, z których jedna (Dolina Zachwytu) została objęta zabiegami ochrony czynnej, a druga (Dolina Sąspowska) pozostawiona naturalnym procesom ekologicznym.

PODSUMOWANIE

W pracy opisano dwie populacje obuwika pospolitego (*Cypripedium calceolus*) zlokalizowane w obrębie Ojcowskiego Parku Narodowego (OPN). Jest to gatunek ściśle chroniony, który zarówno według *Polskiej Czerwonej Księgi Roślin*, jak i *Polskiej czerwonej listy paprotników i roślin kwiatowych* został zaliczony do kategorii narażonych na wyginięcie (VU).

Pierwsza populacja obuwika zlokalizowana po wschodniej stronie w środkowej części Doliny Zachwytu w górnej i środkowej partii zbocza, liczyła 238 pędów (w tym 106 kwitnących). Obuwik porastał zbocze doliny na siedlisku lasu liściastego zaliczanego do grądu *Carpinion betuli*, na powierzchni, na powierzchni zajmującej około 5 ha.

Druga populacja tego gatunku położona w Dolinie Sąspowskiej, w okolicach Złotej Góry, w środkowej części zbocza, na południowy-zachód od Skały Szalej, liczyła 33 pędy (w tym 7 kwitnących). Obuwik występował w lesie liściastym o charakterze buczyny *Fagion sylvaticae*, na powierzchni około 0,4 ha.

Porównując 15 wybranych losowo osobników *Cypripedium calceolus* z obu stanowisk, pod względem podstawowych danych biometrycznych, stwierdzono, że kondycja populacji z Doliny Zachwytu jest nieco lepsza w porównaniu do populacji z Doliny Sąspowskiej. Charakteryzował ją wyższy udział pędów generatywnych, większa wysokość pędów i wielkość liści oraz większa liczba osobników wytwarzających po dwa kwiaty na pędzie. Wynika to z większej dostępności światła na skutek działań związanych z wycinką leszczyny.

Analizy oparte o markery SSR oraz rejon accD-psaI cpDNA wśród osobników badanych populacji obuwika pospolitego w OPN wskazały na wysoki poziom zmienności genetycznej w obrębie obu populacji. Może to świadczyć o ich dobrej kondycji i możliwości losowego krzyżowania się osobników. Na podstawie analizy loci SSR stwierdzono, że każdy z osobników z Doliny Zachwytu reprezentował unikalny genotyp. Z kolei wynik uzyskany dla osobników z Doliny Sąspowskiej świadczył o niemal całkowitym braku udziału rozmnażania wegetatywnego w tej populacji. W celu prawidłowej oceny poziomu klonalności w populacjach z OPN konieczne jest przebadanie dodatkowych loci SSR.

Obecność nieco wyższej zmienności genetycznej w obrębie populacji z Doliny Sąspowskiej w porównaniu do osobników z Doliny Zachwytu, ma prawdopodobnie związek z większym udziałem gęstego podrostu buka, który powoduje ocienienie tego stanowiska. To niekorzystne zjawisko wydaje się nie mieć w chwili obecnej negatywnego wpływu na ograniczenie zmienności genetycznej populacji obuwika z Doliny Sąspowskiej. Może ono jednak być znaczące w przyszłości, co trudno przewidzieć z uwagi na położenie stanowiska w strefie ochrony ścisłej, gdzie służby OPN nie mogą prowadzić żadnych działań ochronnych.

Przeprowadzone analizy świadczą o żywotności i dużym zróżnicowaniu genetycznym badanych populacji obuwika w OPN, wskazując na dobrą perspektywę utrzymania i być może powiększania się ich stanowisk.

Podziękowania

Badania dofinansowano ze środków funduszu leśnego przez Lasy Państwowe (Umowa nr MZ.0290.1.11.2023 z dnia 26.06.2023).

PIŚMIENNICTWO

Babczyńska-Sendek, B. & Sierka, E. (2018). Problemy i perspektywy ochrony warzuchy polskiej *Cochlearia polonica* Frohl. W: *XXVIII Sympozjum Jurajskie: Człowiek i przyroda Wyżyny Krakowsko-Wieluńskiej*, Będzin, 18–34.

Braszewska-Zalewska, A., Bernas, T. & Maluszynska, J. (2010). Epigenetic chromatin modifcations in Brassica genomes. *Genome*, 53, 203–10.

Brzosko, E., Wróblewska, A. & Ratkiewicz, M. (2002). Spatial genetic structure and clonal diversity of island populations of lady's slipper (*Cypripedium calceolus*) from the Biebrza National Park (northeast Poland). *Molecular Ecology*, 11(12), 2499–509.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small Quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.

Edwards, A.W.F. (2008). G.H. Hardy (1908) and Hardy-Weinberg Equilibrium. *Genetics*, 179, 1143–1150.

Kaźmierczakowa, R., Zarzycki, K. & Mirek, Z. (2014). *Polska Czerwona Księga Roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe. Polish Red Data Book of Plants. Pteridophytes and flowering plants*. Wyd. III. Kraków: Instytut Ochrony Przyrody Polskiej Akademii Nauk.

Kaźmierczakowa, R., Bloch-Orłowska, J., Celka, Z., Cwener, A., Dajdok, Z., Michalska-Hejduk, D., Pawlikowski, P., Szczęśniak, E. & Ziarnek, K. (2016). *Polska czerwona lista paprotników i roślin kwiatowych. Polish red list of pteridophytes and flowering plants*. Kraków: Instytut Ochrony Przyrody Polskiej Akademii Nauk.

Kolano, B., Pluciennicza k, A., Kwasniewski, M. & Maluszynska, J. (2008). Chromosomal localization of a novel repetitive sequence in the Chenopodium quinoa genome. *Journal of Applied Genetics*, 49, 313–20.

Kucharczyk, M. (2010). 1902 Obuwik pospolity *Cypripedium calceolus* L. W: J., Perzanowska (red.). *Monitoring gatunków roślin. Przewodnik metodyczny*, 1, (s. 83–98). Warszawa: Biblioteka Monitoringu Środowiska.

Kull, T. (1999). *Cypripedium calceolus* L. *Journal of Ecology*, 87, 913–924.

Leitch, I.J., Kahandawala, I., Suda, J., Hanson, L., Ingrouille, M.J., Chase, M.W. & Fay, M.F. (2009). Genome size diversity in orchids: Consequences and evolution. *Annals of Botany*, 104, 469–481.

Leśniański, G.Z., Piątek, G. & Szmalec, T. (2022). Stan ochrony gatunków roślin w Polsce w roku 2021. *Biuletyn Monitoringu Przyrody* 25(2022/1): 1–136. Biblioteka Monitoringu Środowiska GIOŚ, Warszawa.

Matuszkiewicz, W. (2024). *Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski*. Wyd. 3 PWN, Warszawa.

Minasiewicz, J. & Znaniecka, J.M. (2014). Characterization of 15 novel microsatellite loci for *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) using MiSeq sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 6, 527–529.

Minasiewicz, J., Znaniecka, J.M., Górniak, M. & Kawiński, M. (2018). Spatial genetic structure of an endangered orchid *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) at a regional scale: limited gene flow in a fragmented landscape. *Conservation Genetics*, 19, 1449–1460.

Mirek, Z. & Piękoś-Mirkowa, H. (2008). *Czerwona Księga Karpat Polskich: rośliny naczyniowe*. Kraków: Instytut Botaniki im. W. Szafera Polskiej Akademii Nauk.

Mirek, Z., Piękoś-Mirkowa, H., Zając, A. & Zając, M. (2020). *Vascular plants of Poland: An annotated checklist*. Instytut Botaniki PAN, Kraków.

Myking, T., Vakkari, P. & Skrøppa, T. (2009). Genetic variation in northern marginal *Taxus baccata* L. populations. Implications for conservation. Forestry, 82, 529–539.

Peakall, R. & Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.

Perzanowska, J., Świerkosz, K. & Reczyńska, K. (2015). Subkontynentalne zarośla okołopannońskie 40A0. W: W., Mróz (red.), *Monitoring siedlisk przyrodniczych. Przewodnik metodyczny*, 4, (s. 153–166). Warszawa: Biblioteka Monitoringu Środowiska.

Pullin, A.S. (2005). *Biologiczne podstawy ochrony przyrody*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin. (Dz.U. 2014 poz. 1409).

Rozporządzenie Ministra Klimatu i Środowiska z dnia 6 lipca 2021 r. w sprawie ustanowienia planu ochrony dla Ojcowskiego Parku Narodowego. (Dz.U. z 2021, poz. 1432)

Small, R.L., Ryburn, J.A., Cronn, R.C., Seelanan, T. & Wendel, J.F. (1998). The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *American Journal of Botany*, 85, 1301–1315.

Wolny, E., Braszewska-Zalewska, A. & Hasterok, R. (2014). Spatial distribution of epigenetic modifications in *Brachypodium distachyon* embryos during seed maturation and germination. *PLoS One* 9:e101246. doi:10.1371/journal.pone.0101246.

SUMMARY

This paper describes two populations of *Cypripedium calceolus* L. in Ojców National Park. This is a strictly protected species, classified as Vulnerable (VU) in both the *Polish Red Data Book of Plants* and the *Polish Red List of Pteridophytes and Flowering Plants*.

One population of the lady's slipper orchid was identified in the central part of Zachwytu Valley, on the upper and middle part of the eastern slope. The population consisted of 238 shoots (including 106 flowering ones) growing on a slope covered with deciduous beech forest (*Fagion sylvaticae*) and oak-hornbeam forest (*Carpinion betuli*) on an area of about 5 ha. The other population was found in Sąspowska Valley near Złota Góra, in the middle part of the slope, south-west of Szalej Rock. The population consisted of 33 shoots (including seven flowering ones) growing in a deciduous beech forest (*Fagion sylvaticae*) on an area of about 0.4 ha.

A comparison of 15 randomly selected *Cypripedium calceolus* individuals from the two sites in terms of basic biometric data showed that the Zachwyt Valley population was in a slightly better condition than the Sąspowska Valley population. It was characterised by a higher proportion of generative shoots, greater shoot height and leaf size, and a greater number of individuals producing two flowers per shoot. This is due to the greater availability of light caused by hazel cutting.

Analyses based on SSR markers and the accD-psaI cpDNA region revealed high genetic variability within both populations of the lady's slipper orchid in Ojców National Park. This points to their good condition and the possibility of random interbreeding. The analysis of SSR loci showed that each of the individuals from Zachwytu Valley represented a unique genotype. In turn, the result obtained for individuals from Sąspowska Valley indicates an almost complete lack of vegetative reproduction in this population. In order to correctly assess the level of clonality in the Ojców National Park populations, it is necessary to examine additional SSR loci.

The slightly higher genetic variability within the Sąspowska Valley population compared to the Zachwytu Valley population is probably related to the higher proportion of dense beech undergrowth shading this site. At present, this unfavourable phenomenon does not seem to limit the genetic variability of the lady's slipper orchid in Sąspowska Valley, although it may become a significant factor in the future. However, this is difficult to predict as the site is located in a strict protection zone, where no conservation activities can be carried out.

Our analyses indicate the vitality and high genetic diversity of the studied lady's slipper orchid populations in Ojców National Park, with good prospects for maintaining and perhaps expanding their sites.