

Zastosowanie metod kultur tkankowych w aktywnej ochronie *Saxifraga hirculus* L.

Magdalena KĘDRA

KĘDRA M. 2011. **Application of tissue culture techniques in *ex situ* conservation of endangered species *Saxifraga hirculus* L.** *Wiadomości Botaniczne* 55(3/4): 23–28.

Saxifraga hirculus, an endangered species, is protected under II Annex Nr 1992/43/EEC. Protocol of *in vitro* plant regeneration from seeds and shoots was established. Obtained rooted plantlets were acclimatized and grown in the Botanical Garden in Powsin.

KEY WORDS: *Saxifraga hirculus*, endangered species, plant conservation, tissue culture techniques

Magdalena Kędra, Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, e-mail: magdalena.kedra@uj.edu.pl

WSTĘP

Od czasu Szczytu Ziemi (Konferencja w Rio de Janeiro – 1992 rok) zachowanie różnorodności świata organizmów żywych (bioróżnorodności) stało się podstawowym i jednym z najważniejszych zadań wszelkich programów ochrony przyrody. Jest to odpowiedź na szybko postępujące procesy przekształceń i degradacji środowiska, powodujące wymieranie gatunków na coraz szerszą skalę. W skrajnych przypadkach ochrona zagrożonych gatunków wyłącznie *in situ* okazuje się niewystarczająca. W takiej sytuacji konieczne staje się sięganie po nowe, niekonwencjonalne metody ochrony *ex situ*, w tym metody używane przez współczesną biotechnologię. Jedną z takich metod jest zachowywanie lub namnażanie gatunków w kulturach *in vitro*. Do wiodących ośrodków, które wykorzystują od pewnego czasu tę technikę, należy Ogród Botaniczny w Kew w Wielkiej Brytanii (Peterson, Weigel 2002). Za zastosowaniem kultur *in vitro*

przemawia często nieskuteczność metod tradycyjnego rozmnażania, a także duża wydajność metody *in vitro* pozwalającej namnożyć dużą liczbę nowych osobników z niewielkiej ilości materiału wyjściowego, co jest szczególnie ważne w przypadku skrajnie małych populacji (Krogstrup et al. 1992, Fay 1994). Z końcem ubiegłego wieku zaczęto ją stosować na szerszą skalę w ochronie gatunków ginących. W roku 1999 Pence donosił o wykorzystaniu metody mikropropagacji w ochronie ponad 170 zagrożonych gatunków roślin pochodzących z 60 rodzin z różnych krajów.

OBIEKT I PROBLEMATYKA BADAŃ

W latach 70. i 80. ubiegłego stulecia w wielu krajach europejskich, w związku z bardzo szybko postępującymi procesami przemian antropogenicznych środowiska naturalnego, wiele biotopów zostało silnie przekształconych, a cały szereg związanych z nimi gatunków zaczął

drastycznie zmniejszać areal występowania. Przykładem takiego gatunku jest skalnica torfowiskowa *Saxifraga hirculus* L.

Należy ona do grupy gatunków arktyczno-borealno-górskich o szerokim cyrkumpolarnym zasięgu (Meusel et al. 1965), zaś we florze polskiej uznawana jest za relikw glacialny. Podstawowy obszar jej występowania w Polsce pokrywa się z granicami ostatniego zlodowacenia (Pawłowska 1955). W naturalnych siedliskach występuje tylko na torfowiskach niskich i przejściowych z klasy *Scheuchzeria-Caricetea fuscae* (głównie w fitocenozach ze związku *Caricion lasiocarpae*, rzadziej *Rhynchosporion albae*), w miejscach zasilanych przez wody wysiękowe (Polakowski 1963, Sokołowski 1978, Oberdorfer 1990, Bloch, Załuski 2001). Pod wpływem zmian stosunków wodnych będących wynikiem przemian antropogenicznych, gatunek ten w wielu miejscach wyginął. W Polsce dotyczy to szczególnie stanowisk znajdujących się na skraju jego zasięgu. Do wymarłych należy już dziś np. jedyne znane stanowisko tego gatunku w polskich Karpatach na Molkówce u podnóża Tatr (Piękoś-Mirkowa 2008), podobnie jak liczne stanowiska położone w Polsce centralnej (Zajac, Zajac 2001). Aktualnie największa liczba potwierdzonych stanowisk tego gatunku znajduje się w północnej Polsce, szczególnie w jej wschodniej części (Bloch, Załuski 2001, Zajac, Zajac 2001, Załuski, Bloch-Orłowska 2004).

O powadze problemu świadczy m.in. uwzględnienie tego gatunku w regionalnych i krajowych czerwonych księgach (np.: Żukowski, Jackowiak 1995, Kaźmierczakowa, Zarzycki 2001, Markowski, Buliński 2004) oraz w licznych dokumentach dotyczących ochrony bioróżnorodności, jak np.: I Załącznik do Konwencji o ochronie gatunków dzikiej flory i fauny europejskiej oraz ich siedlisk, tzw. Konwencji Berneńskiej 1996, w II Aneksie Dyrektywy Siedliskowej pod nr 1992/43/EEC, w programie UK Biodiversity Action Plan czy EU's LIFE Nature Fund w Finlandii.

Najskuteczniejszym sposobem ochrony tego gatunku jest ochrona całych jego biotopów (Bloch, Załuski 2001, Załuski, Bloch-Orłowska

2004). Zadanie to jest zazwyczaj realizowane w dłuższym przedziale czasowym poprzez przywracanie wcześniej istniejących warunków hydrologicznych torfowisk oraz ich sąsiedztwa. Jednakże trudności w szybkim odtworzeniu oraz utrzymaniu odpowiedniego stanu danego typu siedlisk sprawiają, że coraz częściej równolegle podejmuje się prace związane z ochroną *ex situ*. W tym przypadku ważną rolę pełnią ogrody botaniczne, w których prowadzona jest uprawa i populacje gatunków zagrożonych utrzymywane są w warunkach kontrolowanych. Uprawy te służą z jednej strony utrzymaniu reprezentatywnej puli genowej, z drugiej są rezerwuarem materiału dla ewentualnej reintrodukcji gatunku na stanowiska naturalne. Przykładem takiej działalności może być Górski Ogród Botaniczny PAN w Zakopanem, gdzie utrzymuje się *ex situ* populację *Saxifraga hirculus* pochodzącą z jedynej, dziś już – jak wspomniano – nieistniejącego, stanowiska karpackiego na Molkówce u podnóża Tatr (Piękoś-Mirkowa, Mirek 2003, Piękoś-Mirkowa 2008).

W przypadku jeszcze istniejących populacji na siedliskach naturalnych *Saxifraga hirculus* zaobserwowano bardzo szybkie tempo zmniejszania się liczebności gatunku. Dlatego obok prowadzonych licznych działań związanych z poprawą stanu hydrologicznego naturalnych siedlisk konieczne było podjęcie takich działań w zakresie jego ochrony, które pozwolą na stosunkowo szybkie i pewne odtworzenie stanu liczebnego gatunku w ginących populacjach. O ile liczne są prace dotyczące taksonomii, struktury i dynamiki populacji, biologii rozmnażania czy ekologii zapylania *S. hirculus* (por. Warncke 1980, Ohlson 1986, 1988, 1989, Welch 2002), o tyle brak jest doniesień na temat rozmnażania i utrzymywania tego gatunku w kulturach *in vitro*.

CEL BADAŃ

Głównym celem prowadzonych badań było: (I) opracowanie metodyki wyprowadzenia kultur tkankowych *Saxifraga hirculus* przez określenie optymalnych warunków dla kiełkowania nasion *in vitro* i wzrostu siewek w tych warunkach; (II)

opracowanie metody regeneracji roślin skalnicy torfowiskowej na drodze organogenezy z pędów przybyszowych; (III) próba aklimatyzacji regenerantów uzyskanych we wcześniejszych etapach hodowli. Badania podjęto głównie ze względu na fakt, że kilka ostatnich osobników, jakie zachowały się ze stanowiska na Molkówce, coraz trudniej było utrzymać i rozmnażać tradycyjnie w Górskim Ogrodzie Botanicznym w Zakopanem. Opracowana metoda *in vitro* pozwoliłaby na namnożenie nowych osobników z niewielkiej ilości materiału wyjściowego, jakim jeszcze dysponujemy w stosunku do tej populacji.

MATERIAŁ I METODY

Pierwszy etap badań, mający na celu opracowanie metody wyprowadzenia kultur tkankowych *Saxifraga hirculus*, przeprowadzono w oparciu o materiał uzyskany z populacji naturalnych, występujących w Polsce północnej, aby nie ryzykować zniszczenia ostatnich zachowanych osobników z populacji z Molkówki. Materiałem były nasiona oraz wierzchołki wzrostu pędu zebrane z osobników populacji występującej koło Jeziora Polgosszcz (53°57'N, 17°52'E)*.

Materiał roślinny (nasiona oraz fragmenty pędów) odkażano, wykorzystując następujące środki: alkohol etylowy (70%), płyn myjąco-odkażający na bazie związków chloru – Domestos™ (10–50%), wodę utlenioną (3%), chlorek rtęci (1%), środek odkażający Plant Preservative Mixture (PPM™, Plant Cell Technology INC., USA; 0,1–1%).

1. Nasiona *S. hirculus* wyłożono na pożywkę sporządzoną wg Murashige i Skoog'a (1962) z połową zawartości makro- i mikroelementów z dodatkiem 1,5% sacharozy (½MS). Po 2 tygodniach nasiona przeniesiono na świeżą pożywkę ½ MS. Nasiona umieszczono na szalkach Petriego zawierających 10 ml pożywki.

2. Odkażone pędy wyłożono na agarową pożywkę MS i umieszczono w słoiczkach zawierających 20 ml pożywki.

Pożywki zestalono agarom (Agar-agar, Merck^R, Germany) w ilości 6 g l⁻¹, pH wszystkich pożywek ustalono przy pomocy 1N NaOH przed dodaniem agaru i autoklawowano w temperaturze 121°C przez 20 min. Kultury skalnicy umieszczono w fitotronie w temperaturze 20°C oraz 25°C, przy 16-godzinnym fotoperiodzie i natężeniu oświetlenia wynoszącym 45 μmol/s·m⁻² (światłówki Fluora™, Osram, Niemcy).

W kolejnym doświadczeniu porównywano wzrost i rozwój pędów rosnących na pożywkach Murashige i Skoog'a (MS) o zmodyfikowanych pH (pH 4,8; 5,8; 6,8) i na pożywce ½ MS o pH 5,8 w temperaturach 20°C oraz 25°C.

Po 6 tygodniach mierzono długość pędu, liczbę liści, korzeni, procent eksplantatów tworzących nowe pędy oraz liczbę nowych pędów. Otrzymane w kulturach tkankowych nowe rośliny skalnicy torfowiskowej płukano pod bieżącą wodą w celu usunięcia pożywki agarowej z korzeni i wysadzano do koreczków torfowych o pH 6 (Jiffy Products International AS, Norway™). Rośliny umieszczano w plastikowych szklarenkach, których przykrycie stopniowo uchylano w celu przystosowania (aklimatyzacji) do warunków polowych. Oprócz stopniowego zmniejszenia wilgotności powietrza zwiększano natężenie oświetlenia. Regeneranty rosły w warunkach 16-godzinnego dnia, w temperaturze 20°C, były podlewane 3 razy w tygodniu, nawożone 1% roztworem płynnego nawozu Florovit (INCO Veritas S.A., Polska) 3 razy w miesiącu. W celu ochrony rośliny opryskiwano środkiem grzybobójczym (0,1% Amistar 250 SC, Target) i owadobójczym (0,05% Talstar 100EC, Target) 1 raz w miesiącu. Po sześciu miesiącach rośliny z jednego wysadzonego pędu utworzyły kępy składające z 4–10 pędów z bardzo dobrze rozwiniętym systemem korzeniowym i w tym stanie przewieziono je do Ogrodu Botanicznego – Centrum Zachowania Bioróżnorodności Biologicznej PAN w Powsinie. Rośliny te następnie wysadzono w tzw. mateczniku (miejsce w inspekcji wyłożone substratem torfowym), a po zaaklimatyzowaniu część osobników przesadzono do gruntu w kolekcji roślin chronionych. W miejscu, gdzie gatunek wysadzono,

* Materiał zebrano za zgodą Ministerstwa Środowiska.

stworzono, poprzez umożliwienie stałego nawodnienia, warunki, które miały być jak najbardziej zbliżone do tych panujących w naturalnym siedlisku.

WYNIKI I Dyskusja

W pracy przetestowano dwie metody wyprowadzenia sterylnych kultur tkankowych skalnicy torfowiskowej z fragmentów pędu oraz z nasion. Pierwsza z metod nie przyniosła pozytywnych rezultatów. Niepowodzeniem zakończyły się bowiem próby odkażenia pędów skalnicy ze względu na obecność w tkance roślinnej patogenów (infekcje pierwotne), które zniszczyły eksplantaty. Dlatego do założenia sterylnej kultury tkankowej i wyprowadzenia stoku roślin wykorzystano siewki wyprowadzone z nasion w warunkach *in vitro*, uzyskane dzięki opracowaniu skutecznej procedury. Najlepszym sposobem odkażania nasion okazał się środek PPM w stężeniu 0,2%. Wyłożone na pożywkę ½ MS nasiona kiełkowały po ok. 2–3 tygodniach. Kiełkowanie obserwowane było nawet po 7 miesiącach od założenia kultury i wyłożenia na pożywkę. Otrzymane siewki były przenoszone na nowe pożywki i namnażane przez okres 5–6 miesięcy w celu uzyskania odpowiedniej liczby eksplantatów, potrzebnej do założenia doświadczenia badającego wpływ pH i temperatury na wzrost i rozwój skalnicy torfowiskowej.

Eksplantaty wierzchołków pędu wysadzone na pożywki bez regulatorów wzrostu w temperaturach 20°C lub 25°C oraz przy pH 4,8 lub 5,8 lub 6,8 wykazywały normalny rozwój i wzrost. Wpływ pH uwidaczniał się we wroście i rozwoju pędów na pożywce. Obserwowano również zróżnicowaną morfogenezę. W zależności od warunków temperatury hodowli i pH pożywki, eksplantaty formowały różną liczbę liści, korzeni lub nowych pędów. Otrzymane wyniki pokazały, że wzrost pędów i tworzonych przez nie liści osiąga maksimum przy pH 5,8 i są one wyraźnie niższe zarówno przy pH 4,8 jak i 6,8. Natomiast przy pH 4,8 i 6,8 obserwowano formowanie nowych pędów, podczas gdy rośliny rosnące w warunkach pH 5,8 ich nie formowały.

Wpływ temperatury zaznaczał się wyraźnie w tempie wzrostu pędów. Temperatura 25°C nasilała ujemny wpływ pH i rośliny rosły wolniej. Najdłuższe pędy otrzymano na pożywce ½ MS niezależnie od temperatury. Pędy i liście roślin rosnących w temperaturze 20°C były grubsze i intensywniej zabarwione niż te, które rosły w temperaturze 25°C. W prowadzonych kulturach tkankowych stwierdzono także różnice w ukorzenianiu eksplantatów. W temperaturze 25°C korzenie były krótsze i w dwukrotnie mniejszej liczbie niż w temperaturze 20°C.

Młode rośliny otrzymywane z kultur tkankowych, a następnie przenoszone do otwartej hodowli, narażone są na szok fizjologiczny związany z wysychaniem i odmiennymi warunkami oświetlenia oraz szkodliwym działaniem patogenów i dlatego wymagają stopniowej aklimatyzacji do nowych warunków. W związku z tym ukorzenione rośliny zostały wysadzone w doniczkach torfowych (koreczki torfowe) i aklimatyzowane najpierw w warunkach szklarniowych. Mimo tych starań przetrwało tylko około 40% roślin, które następnie przesadzono do gruntu. Wszystkie te rośliny później rosły i rozwijały się już prawidłowo. W latach 2007–2008 skalnica na specjalnie utworzonym poletku z dodatkowym systemem nawadniania w Ogrodzie Botanicznym w Powsinie rozrosła się, tworząc kępki. W drugim roku uprawy w gruncie zaobserwowano kwitnienie *S. hirculus*. Ten stan stwarzał nadzieję na dalszy dobry rozwój populacji. Niestety, w 2009 roku okazało się, że rośliny na stanowisku w ogrodzie, gdzie od początku stosowano dodatkowe nawadnianie, nie podjęły dalszego wzrostu i wyginęły (A. Gasek, J. Podlasiak – inf. ustna), natomiast te, które rosły w mateczniku w warunkach mniejszego uwilgotnienia, odznaczały się dobrym wzrostem i z tej grupy część została przesadzona na stanowisko w otwartej części ogrodu.

Saxifraga hirculus, jako gatunek o charakterze borealnym, lepiej rośnie w nieco niższych temperaturach niż rośliny strefy klimatu umiarkowanego. Potwierdzają to wyniki uzyskane w warunkach kultur tkankowych. Rośliny, które rosły w temperaturze wyższej (25°C) były

niższe i słabiej ukorzenione od roślin rosnących w temperaturze 20°C. Z literatury wynika, że w naturalnych warunkach *S. hirculus* rośnie głównie przy pH wahającym się od 5,8 do 7,5, natomiast pH poniżej 5 stanowi czynnik ograniczający jej rozwój (Kosiński 2000, Welch 2002). Obserwacje skalnicy torfowiskowej w hodowli kultur tkankowych wykazały, że w warunkach pH poniżej 5 oraz powyżej 6 rośliny są stymulowane do tworzenia nowych pędów czyli do rozmnażania wegetatywnego.

WNIOSKI

Wyniki doświadczenia wskazują, że mikrorozmnażanie *Saxifraga hirculus* może stanowić jedną z technik użytecznych w aktywnej ochronie tego gatunku. Do czasu opracowania lepszego sposobu sterylizacji wierzchołków pędu, materiał wyjściowy mogą stanowić na razie tylko nasiona. Optymalne warunki dla kiełkowania nasion *in vitro* i wzrostu siewek jakie ustalono w niniejszej pracy, to: temperatura 20°C, oświetlenie, pożywka ½ MS z dodatkiem 0,2% PPM. Kiełkowanie rozpoczyna się wówczas po około 2 tygodniach. Regeneracja roślin przebiega najkorzystniej w temperaturze 20°C. Sama aklimatyzacja regenerantów w warunkach szklarniowych przebiega powoli, wymaga zastosowania wielu zabiegów ochronnych w celu zabezpieczenia przed patogenami i owadami roślinożernymi.

Obserwacje założonego w Ogrodzie Botanicznym PAN w Powsinie matecznika (rośliny umieszczone w skrzynkach z substratem torfowym i wysadzone do inspektu) i hodowla zachowawcza skalnicy torfowiskowej wyprowadzonej z kultur *in vitro* w warunkach ogrodu botanicznego, wskazują na możliwość użycia tej techniki w ochronie gatunku jako metody wspomagającej. Jednak ustalenie odpowiedniego siedliska dla roślin rozmnożonych na drodze kultur tkankowych wymaga dalszych badań dla ustalenia najbardziej sprzyjających czynników i warunków uprawy *ex situ* w ogrodzie botanicznym.

Na obecnym etapie badań zastosowanie metody kultur tkankowych na szerszą skalę

ograniczane jest głównie niepowodzeniami w uzyskiwaniu eksplantatów z organów wegetatywnych. M.in. ta przeszkoda uniemożliwiła jak dotychczas wykorzystanie tej techniki do rozmnożenia małej populacji podtatrzańskiej, której osobniki utrzymują się w ostatnich latach wyłącznie w stanie płonnym. Jeżeli odnotowano zakwitanie, to były to tylko pojedyncze kwiaty, które nie produkowały płodnych nasion.

PODZIĘKOWANIA. Badania wykonano w ramach grantu MNiSW nr 2 P04G 082 26. Materiał został zebrany za zgodą nr DOPwe-421-28/03/rk Ministerstwa Środowiska.

Szczególne podziękowania kieruję do prof. dr. hab. Zbigniewa Mirka za merytoryczne dyskusje podczas przygotowywania manuskryptu. Wyrażam wdzięczność dr Elżbiecie Cieślak i dr. Wojciechowi Paulowi za wnikliwe przeczytanie tekstu i konstruktywne sugestie, a także Elżbiecie i Jakubowi Cieślakom oraz dr Joannie Bloch-Orłowskiej za pomoc przy zbiorze materiału.

Dziękuję prof. dr. hab. Jerzemu Puchalskiemu, dyrektorowi Ogrodu Botanicznego CZRB PAN w Powsinie, za udostępnienie powierzchni doświadczalnej dla kolekcji *S. hirculus* oraz Paniom mgr Jolancie Podlasiak i tech. ogr. Annie Gasek za szczerą opiekę nad tą kolekcją.

LITERATURA

- BLOCH J., ZAŁUSKI T. 2001. *Saxifraga hirculus* L. W: R. KAŻMIERCZAKOWA, K. ZARZYCKI (red.), Polska Czerwona Księga Roślin. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków, s. 182–183.
- FAY M. F. 1994. In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation. *Biodiversity and Conservation* 3: 176–183.
- KAŻMIERCZAKOWA R., ZARZYCKI K. (red.) 2001. Polska Czerwona Księga Roślin. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków.
- KOSIŃSKI I. 2000. Skalnica torfowiskowa *Saxifraga hirculus* L. we Wdzydzkim Parku Krajobrazowym. *Saxifraga hirculus* at Wdzydze Landscape Park. *Badania Fizjograficzne nad Polską Zachodnią, Seria B* 49: 185–188.
- KROGSTROP P., BALDURSSON S., NORGAARD J. V. 1992. *Ex situ* genetic conservation by use of tissue culture. *Opera Bot.* 113: 49–53.

- MARKOWSKI R., BULIŃSKI M. 2004. Ginące i zagrożone rośliny naczyniowe Pomorza Gdańskiego. *Acta Botanica Cassubica, Monographiae* **1**: 1–75.
- MEUSEL H., JÄGER E., WEINERT E. 1965. Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora, 1. Karten. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- OBERDORFER E. 1990. Pflanzensoziologische Exkursionsflora. 6. Aufl. E. Ulmer Verl., Stuttgart.
- OHLSON M. 1986. Reproductive differentiation in a *Saxifraga hirculus* population along an environmental gradient on a central Swedish mire. *Holarctic Ecology* **9**: 205–213.
- OHLSON M. 1988. Variation in tissue element concentration in mire plants over a range of sites. *Holarctic Ecology* **1**: 267–279.
- OHLSON M. 1989. Ecotypic differentiation and phenotypic plasticity in *Saxifraga hirculus* populations in central and northern Sweden. *Holarctic Ecology* **12**: 46–53.
- PAWŁOWSKA S. 1955. *Saxifraga* L. W: W. SZAFER, B. PAWŁOWSKI (red.), Flora Polska. Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych, **7**. Polska Akademia Nauk, Warszawa, s. 54–55.
- PENCE V. C. 1999. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. W: E. E. BENSON (red.), Plant Conservation Biotechnology, Chapter **15**. Taylor and Francis, London, s. 227–241.
- PETERSON C. L., WEIGEL R. C. 2002. In vitro propagation of *Conradina etonia*. *Florida Scientist* **65**(3): 201–207.
- PIĘKOŚ-MIRKOWA H. 2008. Skalnica torfowiskowa, *Saxifraga hirculus* L. W: Z. MIREK, H. PIĘKOŚ-MIRKOWA (red.), Czerwona Księga Karpat Polskich, Rośliny naczyniowe. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków, s. 224–225.
- PIĘKOŚ-MIRKOWA H., MIREK Z. 2003. *Saxifraga hirculus* L. W: Atlas roślin chronionych. Multico Oficyna Wydawnicza. Warszawa, s. 432–433.
- POLAKOWSKI B. 1963. Stosunki geobotaniczne Pomorza Wschodniego. Die geobotanischen Verhältnisse im östlichen Pomorze. *Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie* **15**(1): 1–167.
- SOKOŁOWSKI A. W. 1978. Projektowany rezerwat Wilkokuk w Puszczy Augustowskiej. *Chrońmy Przyrodę Ojczystą* **34**(1): 60–65.
- WARNCKE E. 1980. Spring areas: ecology, vegetation, and comments on similarity coefficients applied to plant communities. *Holarctic Ecology* **3**: 233–308.
- WELCH D. 2002. The establishment of recovery sites for *Saxifraga hirculus* in NE Scotland. *Botanical Journal of Scotland* **54**: 75–88.
- ZAJĄC A., ZAJĄC M. (red.) 2001. Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce. Nakładem Pracowni Chorologii Komputerowej Instytutu Botaniki UJ, Kraków.
- ZALUSKI T., BŁOCH-ORŁOWSKA J. 2004. *Saxifraga hirculus* L., Skalnica torfowiskowa. W: B. SUDNIK-WÓJCIKOWSKA, H. WERBLAN-JAKUBIEC (red.), Gatunki roślin. Poradnik ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręcznik metodyczny, **9**. Ministerstwo Środowiska, Warszawa, s. 180–183.
- ŻUKOWSKI W., JACKOWIAK B. 1995. Ginące i zagrożone rośliny naczyniowe Pomorza Zachodniego i Wielkopolski. *Prace Zakładu Taksonomii Roślin Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu* **3**: 1–141.