

Zmienność taborskiej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z Nadleśnictwa Miłomłyn wyrażona w analizie cech morfologii igieł oraz polimorfizmie mikrosatelitarnego DNA

Variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) called Tabórz pine (Forest District Miłomłyn) expressed in analysis of morphology of needle traits and polymorphism of microsatellite DNA

Paulina Lesiczka, *Ewa M. Pawlaczyk, Bartosz Łabiszak, Lech Urbaniak

Zakład Genetyki; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; ul. Umultowska 89; 61-614 Poznań

*Tel. 61 829 58 66, e-mail: ewapaw@amu.edu.pl

Abstract. Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is one of the most widespread forest trees in the world, ranging from southern Mediterranean mountains to eastern Siberia. 30 trees of Scots pine from the Miłomłyn Forest District were analyzed in terms of 7 nuclear and 8 chloroplast microsatellite DNA loci as well as 7 morphological needle traits. Nuclear microsatellites (Simple Sequence Repeats) have proved to be useful in studying phylogeographic and gene flow patterns in conifers and are being used to infer the demographic history of tree species. A population's genetic diversity, in fact, represents an important criterion which could be applied in planning future forest management and breeding. Additionally, many elements of Scots pine morphology, including needle traits, are subject to environmental modification. However, the adaptability of those traits remains, to some extent, under genetic control. The trees we investigated here are called Tabórz pine located in the northeast of Poland. This population is described as one of the best in Poland and even in Europe regarding bio mass production, ductility and wood quality. The aim of the study was to determine variation and genetic structure within this population. An analysis of phenotypic differentiation showed that the traits which differed the most between individuals were needle length, the number of serrations per 2 mm of needle length along the right edge and the number of stomatal rows on the convex side of the needles. In Tabórz pine, we detected 30 different genotypes with 87 alleles as well as 28 haplotypes with 30 alleles. We also revealed a slight excess of homozygotes, but the population is still in Hardy-Weinberg equilibrium. The Scots pine population from Tabórz furthermore showed a higher level of genetic diversity compared to stands from other Polish and European regions. This diversity may be the main factor impacting on the population's wood quality and its breeding value.

Keywords: Scots pine from Tabórz, needle morphology, nuclear (nrSSR) and chloroplast (cpSSR) microsatellite DNA, genetic variation

1. Wstęp

Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) jest głównym gatunkiem lasotwórczym w Polsce, gdzie stanowi około 71,5% składu gatunkowego lasów (Czerwiński 1993). Ogromny zasięg geograficzny jej występowania, rozciągający się w kierunku wschód-zachód na dystansie około 14 tys. km, od wschodniej Rosji do zachodniej Hiszpanii, a w kierunku północ-południe od Norwegii do Gór Sierra-Nevada w Hiszpanii na dystansie około 2700 km, stanowi o jej najrozleglejszym zasięgu spośród gatunków rodzaju *Pinus*. Duża różnorodność środowisk, w jakich występuje, sprawiła, że w obrębie gatunku wykształciły się liczne typy, ekotypy, odmiany i formy, a nawet rasy (Boratyński 1993).

Obserwowane obecnie genetyczne międzypopulacyjne zróżnicowanie sosny zwyczajnej wynika z jej rozległego eurosyberyjskiego zasięgu, pochodzenia odrębnych geograficznie populacji z różnych ostoi glacialnych, procesów mikroewolucyjnych zachodzących podczas migracji pyłku i nasion po ostatnim zlodowaceniu oraz dominującego krzyżowego zapylenia (Critchfield, Little 1966; Rudin, Lindgren 1977; Shen et al. 1981; Sinclair et al.; 1998, Soranzo et al. 2000; Cheddadi et al. 2006; Labra et al. 2006; Naydenov et al. 2007; Pyhäjärvi et al. 2008). Populacje sosny zwyczajnej w skali europejskiej wykazują również charakterystyczną zmienność klinalną związaną między innymi z pędzeniem wiosennym czy też charakterystyczną zmiennością igieł obserwowaną w transektach północ-południe (Giertych

Wpłynęło: 12.02.2016 r., zrecenzowano: 19.04.2016 r., zaakceptowano: 19.01.2017 r.

1993, Urbaniak 1998). Ponadto na dużą zmienność sosny ma wpływ długi czas trwania pokoleń, w przypadku sosny zwyczajnej może to być nawet 500 lat (Pravdin 1964). Na terenie Polski najstarsze datowania wieku u tego gatunku wskazują na 400 lat i dotyczą sosny pienińskiej z Sokolicy (Niedzielska 2001). Dodatkowo na obecny obraz zmienności sosny na terenie Polski znaczący wpływ miał import nasion obcego, często nieokreślonego pochodzenia. Genetyczny obraz struktury wewnątrzgatunkowej sosny został również ukształtowany przez procesy mikroewolucyjne (dobór naturalny, dryf genetyczny, mutacje, migracje itp.) zachodzące w samych populacjach. Dowodem na to są charakterystyczne, posiadające odrębne cechy adaptacyjne populacje polskie: zachodniopolska (z Bolewic), taborska (z Taborza), supraślska (z Supraśla), janowska (z Janowa Lubelskiego), rychtalska (z Rychtala). Odrębne są również populacje górskie z terenu Tatr i Pienin (Przybylski 1970; Staszkiwicz 1970; Giertych 1980).

Na specjalną uwagę zasługuje populacja sosny taborskiej z północno-wschodniej Polski (Nadleśnictwo Miłomłyn). Sosna taborska jest uważana za populację o wyjątkowej wartości gospodarczej w Polsce i w badaniach proveniencyjnych została oceniona dobrze. Wartość hodowlana tej populacji określona na podstawie cech ilościowych i jakościowych wynika z prostej, gonnej i walcowatej strzały, delikatnego ugałżenia oraz odporności na osutkę. Charakteryzuje się dużą energią wzrostu, produkcją masy i plastycznością oraz wysoką jakością drewna. Cechy te sytuują ją w gronie najlepszych proveniencji w skali europejskiej (Fabijanowski 1961; Giertych 1980; Cierniewski, Giertych 1982; Giertych 1986; Matras 1989; Giertych, Oleksyn 1992; Korczyk 2002). Sosna taborska swoją dużą wartość hodowlaną zawdzięcza optymalnym wartościom siedliska, w którym egzystuje, czyli na głębokich piaskach słabo gliniastych (morenowych), zalegających na piasku luźnym, ze znaczną (do 5,1%) zawartością próchnicy. Wykształcaniu najdorodniejszych egzemplarzy dla tego gatunku poza żyznością siedliska sprzyja także bodźcowe oddziaływanie konkurencji ze strony otaczających drzew i krzewów (przede wszystkim dębu) (Giertych 1980; Giertych 1986).

W celu jej ochrony, w 1957 roku został utworzony Rezerwat Leśny „Sosny Taborskie” w okolicach Taborza (gmina Łukta). Na powierzchni ok. 95 ha objęto ochroną m.in. starodrzew sosnowy, tzw. ekotyp taborski. Rosną tu sosny mające 250–270 lat, osiągające nawet 40 m wysokości. Stare sosny rosnące w Rezerwacie „Sosny Taborskie” nadal owocują. Ich szyszki są o połowę mniejsze od szyszek sosen w pełnym rozwoju, ale utrzymują one pierwszą klasę jakości nasion (Boratyński 1993; http://podroze.gazeta.pl/podroze/1,114158,8682845,Polska__Sosna_Taborska.html).

Celem niniejszych badań było opisanie zmienności oraz struktury genetycznej cennej użytkowo sosny taborskiej rosnącej w rezerwacie oraz poza jego obszarem w Nadleśnictwie Miłomłyn. Sosnę tę badano zarówno pod względem cech fenotypowych (cechy igieł) jak i pod względem polimorfizmu mikrosatelitarnego jądrowego i chloroplastowego DNA.

2. Materiał i metody

Analiza igieł

Analizowano zmienność wewnątrzpopulacyjną sosny zwyczajnej z Nadleśnictwa Miłomłyn. Do badań posłużyło łącznie 30 drzew; 17 z rezerwatu „Sosny Taborskie”, pozostałych 13 z okolicznych leśnictw: Perskie, Ruś, Zakątek, Tabórz i Sarni Dół (ryc. 1, tab.1). Z każdego drzewa analizowano po dziesięć dwuletnich igieł z wystawy południowej, zebranych z dziesięciu różnych długopędów. Do czasu analiz materiał przechowywano w 70% alkoholu etylowym. W sumie analizie poddano 300 igieł. Badane cechy morfologiczne igieł dotyczyły: 1 – długości igły, 2 – liczby rzędów aparatów szparkowych występujących po stronie płaskiej igły, 3 – liczby aparatów szparkowych przypadających na 2 mm długości igły po stronie płaskiej, 4 – liczby rzędów aparatów szparkowych występujących po stronie wypukłej igły, 5 – liczby aparatów szparkowych przypadających na 2 mm długości igły po stronie wypukłej, 6 – liczby ząbków występujących na długości 2 mm na lewym brzegu igły oraz 7 – liczby występujących ząbków na długości 2 mm na prawym brzegu igły.

Badania molekularne

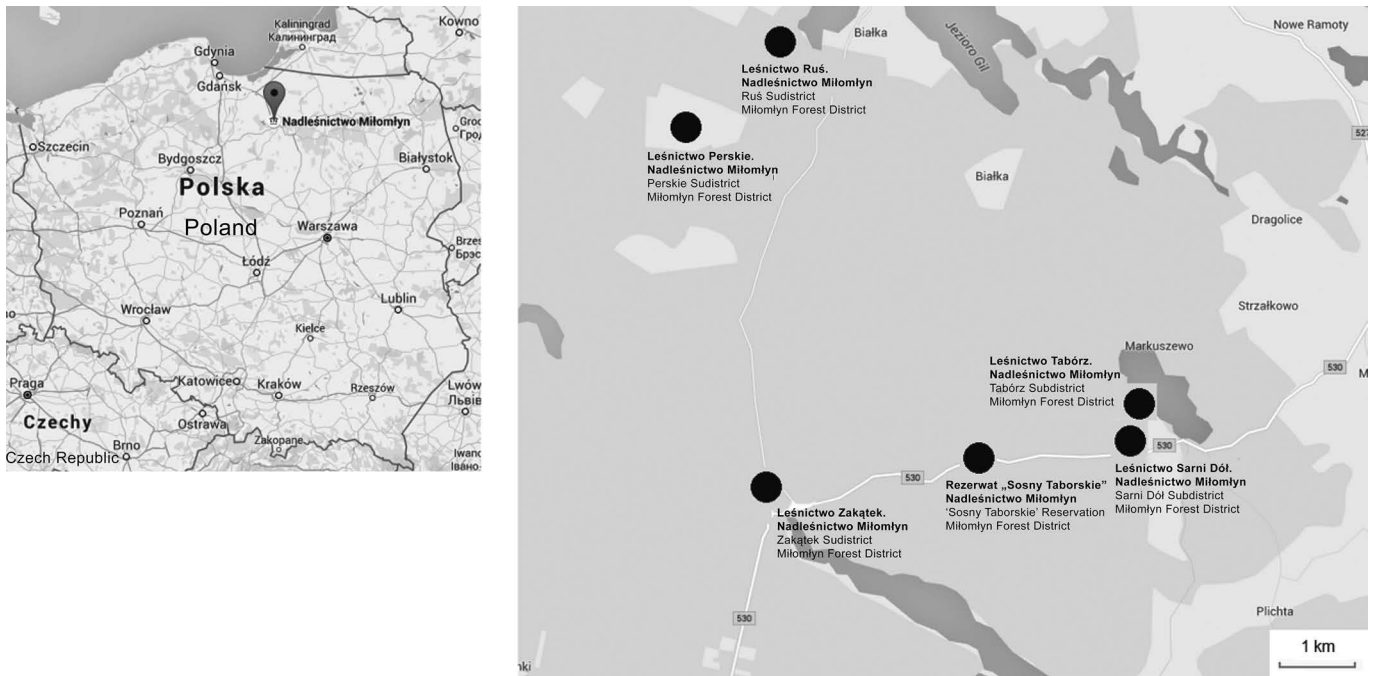
Ekstrakcja genomowego DNA

Genomowy DNA był izolowany z igieł. Zmrożone i pocięte igły (100 mg tkanki) zostały zhomogenizowane w ciekłym azocie. DNA wyizolowano metodą Doyle i Doyle (Doyle, Doyle 1990), wykorzystując bufor CTAB. DNA został rozpuszczony w 0,1 × buforze TE (10 mM pH 8,0 Tris-HCl; 1 mM pH 8,0 EDTA) do dalszego wykorzystania. Jakość i ilość

Tabela 1. Lokalizacja badanych drzew sosny zwyczajnej w obrębie Nadleśnictwa Miłomłyn

Table 1. Location of studied Scots pine trees in Miłomłyn Forest District

Numer drzewa Tree number	Leśnictwo / Forest Department	Oddział Compartiment
1, 3	Leśnictwo Perskie – LP	7c
2	Leśnictwo Perskie – LP	28
4, 5	Leśnictwo Ruś – LR	91d
6–8	Leśnictwo Zakątek – LZ	146 g, i
9, 10	Leśnictwo Tabórz – LT	104 c
11, 12	Leśnictwo Sarni Dół – LSD	120 d
13	Leśnictwo Tabórz – LT	90 d
14–30	Rezerwat Sosny Taborskiej (RST) – Leśnictwo Tabórz	94 c



Rycina 1. Lokalizacja badanych subpopulacji sosny zwyczajnej w obrębie Nadleśnictwa Miłomłyn
 Figure 1. Location of studied Scots pine subpopulations in Miłomłyn Forest District

wyekstrahowanego DNA sprawdzono na spektrofotometrze Nanodrop™ ND-1000 (firmy ThermoScientific), następnie rozcieńczono do końcowego stężenia 20 ng/μl.

Amplifikacja DNA

Przebadano siedem loci jądrowego mikrosatelitarnego DNA (nrSSR): PtTX3107, PtTX3116, PtTX4001, PtTX4011, SPAC11.4, SPAC12.5, SPAG7.14 (Soranzo et al. 1998; Elsik et al. 2000; Aucland et al. 2002; Zhou et al. 2002) oraz osiem loci chloroplastowego mikrosatelitarnego DNA (cpSSR): PCP1289, PCP30277, PCP41131, PCP45071, PCP71987, Pt45002, Pt30204, Pt71936 (Vendramin et al. 1996; Provan et al. 1999). Sekwencje starterów oraz motywy powtórzeniowe zostały podane w wyżej wymienionych pracach. Reakcje PCR były wykonywane w termocyklerze 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®). Każda reakcja amplifikacji dla nrSSR była wykonywana w objętości 10 μl. Mieszanka reakcyjna zawierała 1 × bufor reakcyjny (Novazym), 0,2 mM dNTP, 0,25 μM starterów w obu kierunkach (F i R), 0,5 jednostki polimerazy HiFiTaq DNA (Novazym), 60 ng genomowego DNA oraz wodę dejonizowaną. Dla markerów jądrowych zastosowano następujący profil reakcji PCR: 3 min. 95°C, następnie 40 cykli – 15 s w 95°C, 1 min. w 58°C (dla markerów PtTX) lub 60°C (dla markerów SPAC/G), 30 s w 72°C i końcowe wydłużanie przez 10 min. w 72°C. Każdy z markerów jądrowego mikrosatelitarnego DNA był amplifikowany w pojedynczej reakcji PCR.

Dla loci chloroplastowych zaprojektowano dwie reakcje PCR typu multipleks. W skład multipleksu I wchodziły loci: Pt30204, Pt71936, PCP1289, PCP41131. Multipleks II obejmował loci: PCP30277, Pt71987, PCP45071, Pt45002.

Reakcja amplifikacji dla cpDNA była wykonywana w objętości 6 μl. Mieszanka reakcyjna zawierała 1x Type-it® Microsatellite PCR Kit, 1x Q-Solution, 0,2 μM starterów w obu kierunkach (F i R) oraz wodę dejonizowaną. DNA chloroplastowy był amplifikowany w 95°C przez 5 min., następnie 30 cykli – najpierw 30 s w 95°C, 1 min i 30 s w 50°C i 30 s w 72°C. Końcowe wydłużanie odbywało się przez 30 min. w 60°C.

Jeden ze starterów każdego locus, zarówno jądrowego jak i chloroplastowego, (F – forward) był wyznakowany fluorescencyjnie (barwniki: 6FAM – niebieski, VIC – zielony, NED – żółty i PET – czerwony), aby uniknąć pomyłki przy odczytywaniu różnych loci o podobnych długościach alleli. Produkty amplifikacji zostały poddane elektroforezie kapilarnej wspólnie na sekwenatorze 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) z użyciem standardu wielkości GeneScan™600LIZ™. Wyniki zostały odczytane przy wykorzystaniu programu Peak Scanner ver. 1.0. (Applied Biosystems®).

Metody statystyczne

Na podstawie danych uzyskanych z pomiaru cech igieł wykonano analizę statystyczną w programie Statistica PL firmy StatSoft. Obliczono charakterystyki zastosowanych cech: średnią arytmetyczną (dla każdego osobnika i całej populacji), odchylenie standardowe, minimum i maksimum oraz współczynniki zmienności. Zastosowano grupowanie aglomeracyjne metodą UPGMA na odległościach Mahalanobisa. Na podstawie statystyki F w analizie wariancji (ANOVA) stwierdzono, która cecha najbardziej różni poszczególne osobniki. Obliczono również współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy badanymi cechami igieł.

Dla każdego locus jądrowego obliczono: liczbę alleli w locus, efektywną liczbę alleli w locus, obserwowaną i oczekiwana heterozygotyczność, współczynnik wsobności, test na niedobór heterozygot zgodnie z równowagą Hardy'ego-Weinberga, oraz odległości genetyczne Nei'a (Nei 1972) za pomocą programów PopGene32 (Yeh et al. 2000) oraz GenAlEx (Peakall, Smouse 2006). Zastosowano również korektę wyników o obecność alleli zerowych programem Inest 2.0 (Chybicki, Burczyk 2009)

Dla każdego locus chloroplastowego obliczono: liczbę alleli w locus, efektywną liczbę alleli w locus, współczynnik zróżnicowania genetycznego na podstawie częstości alleli i haplotypów oraz odległości genetyczne Nei'a za pomocą programów PopGene32 oraz GenAlEx. Dla loci jądrowych jak i chloroplastowych, w oparciu o metodę UPGMA, za pomocą programu MEGA (Tamura et al. 2013) na odległościach genetycznych Nei'a skonstruowano dendrogramy.

3. Wyniki i dyskusja

Wyniki prezentowane w pracy rozpatrywać należy na dwóch płaszczyznach: zmienności genetycznej wyrażonej przez polimorfizm jądrowego DNA (nrDNA, ang. *nuclear DNA*) i chloroplastowego DNA (cpDNA, ang. *chloroplast DNA*) oraz zmienności cech morfologicznych igieł. Genom jądrowy u roślin nagozalążkowych dziedziczony jest po obojgu rodzicach, natomiast genom chloroplastowy jest dziedziczony jednorodzicielsko, w linii ojcowskiej, poprzez pyłek. Istotne jest, iż z powodu proporcjonalnie większej efektywnej wielkości genomu jądrowego w stosunku do chloroplastowego ten ostatni jest narażony na szybszą utratę zmienności genetycznej szczególnie w przypadku fluktuacji liczebności populacji (Pamilo, Nei 1988). W konsekwencji markery jądrowe i organellowe mogą odmiennie wyrażać historię demograficzną populacji jak i efekty tzw. „szyjki butelki” (ang. *bottleneck*) czy też dryfu genetycznego.

Analiza cech morfologicznych igieł

Przeanalizowano 7 cech igieł obrazujących zakres plastyczności badanej populacji. Na podstawie charakterystyk cech (tab. 2) określono, że dla populacji z Miłomłyna zmienność cech mieści się między 9 a 20%. Najmniej zmienne były cechy 3 i 5, a najbardziej cechy 4 i 2. Długość igły (cecha 1) oscylowała pomiędzy 48 a 101 mm, a średnia wynosiła 73,1 mm. Liczba rzędów aparatów szparkowych po obydwu stronach igły (cecha 2 i 4) wahała się pomiędzy 1 a 18 i średnio była niższa po stronie płaskiej igły (8,8) niż po wypukłej (9,6). Różnice te zbadano testem t-Studenta i były one statystycznie istotne ($p=0,000006$). Liczba aparatów szparkowych na dł. 2 mm po obydwu stronach igły (cecha 3 i 5) oscylowała pomiędzy 8 a 29 i była średnio nieznacznie wyższa po płaskiej stronie igły (21,0) niż po wypukłej (20,8). Różnice te nie były statystycznie istotne ($p=0,478$). Liczba ząbków po obu stronach igły (cecha 6 i 7) oscylowała pomiędzy 4 a 11 i była średnio nieznacznie wyższa po prawej stronie igły

Tabela 2. Statystyki opisowe badanych 7 cech igieł sosny zwyczajnej z Miłomłyna

Table 2. Descriptive statistics of 7 studied needles traits of Scots pine from Miłomłyn

Cecha Trait	Średnia Mean	Min	Max	V%	Skośność Asymmetry	Kurtosis
1	73,1	48	104	13,35	0,34	-0,04
2	8,8	6	14	17,83	0,52	0,33
3	21,0	8	27	9,46	-0,66	5,29
4	9,6	1	18	19,50	0,15	1,86
5	20,8	10	29	9,95	-0,65	4,49
6	7,3	4	10	16,33	0,23	-0,23
7	7,6	4	11	15,33	0,26	0,22

min – wartość minimalna, max – wartość maksymalna, V% – współczynnik zmienności

min – minimum value, max – maximum value, V% – coefficient of variation

Cechy: 1 – długość igły, 2 – liczba rzędów aparatów szparkowych występujących po stronie płaskiej igły, 3 – liczba aparatów szparkowych przypadających na 2 mm długości igły po stronie płaskiej, 4 – liczba rzędów aparatów szparkowych występujących po stronie wypukłej igły, 5 – liczba aparatów szparkowych przypadających na 2 mm długości igły po stronie wypukłej, 6 – liczba ząbków występujących na długości 2 mm na lewym brzegu igły oraz 7 – liczba występujących ząbków na długości 2 mm na prawym brzegu igły.

Traits: 1 – length of the needles (mm), 2 – number of stomata rows on the flat sides of the needles, 3 – number of stomata per 2 mm length on the flat sides of the needles, 4 – number of stomata rows on the convex sides of the needles, 5 – number of stomata per 2 mm length on the convex sides of the needles, 6 – number of serrations per 2 mm needle length on the left-hand edges, 7 – number of serrations per 2 mm needle length on the right-hand edges.

(7,6) niż po lewej (7,3). Różnica ta była jednak statystycznie istotna ($p=0,000195$).

Dodatkowo obliczono charakterystyki cech dla sześciu subpopulacji sosny z Miłomłyna (tab. 3). Najdłuższymi igłami (cecha 1) charakteryzowały się sosny z Leśnictwa Sarni Dół (LSD), a najkrótszymi z Leśnictw Perskie (LP) i Ruś (LR). Największą liczbę rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły (cecha 2) miały sosny z Leśnictwa Tabórz (LT) a najmniejszą sosny z Leśnictw Perskie (LP) i Sarni Dół (LSD). Z kolei na wypukłej stronie igły (cecha 4) największą liczbą rzędów charakteryzowały się sosny z Leśnictw Zakątek (LZ) i Tabórz (LT), a najmniejszą z Leśnictwa Sarni Dół (LSD). Największą liczbę aparatów szparkowych na 2 mm na płaskiej stronie igły (cecha 3) odnotowano u sosen z Leśnictwa Tabórz (LT), a najmniejszą z Leśnictwa Ruś (LR), natomiast na wypukłej stronie igły (cecha 5) najwięcej aparatów szparkowych miały sosny z Leśnictwa Perskie (LP), a najmniej z Leśnictwa Ruś (LR). Największą liczbę ząbków występujących na długości 2 mm na lewym brzegu igły (cecha 6) stwierdzono u sosen z Leśnictwa Tabórz (LT), a najmniejszą z Leśnictwa

Tabela 3. Statystyki opisowe badanych 7 cech igieł w subpopulacjach.

Table 3. Descriptive statistics of 7 studied needles traits in subpopulations.

Cecha Trait	Subpopulacja Subpopulation	Średnia Mean	Min	Max	V%	Cecha Trait	Subpopulacja Subpopulation	Średnia Mean	Min	Max	V%
1	LP	67,8	56	78	7,63	5	LP	22,0	18	25	7,16
	LR	67,8	57	80	9,37		LR	19,5	17	24	8,56
	LZ	76,9	52	91	11,08		LZ	21,1	17	24	8,22
	LT	73,0	60	82	7,73		LT	21,5	19	27	9,68
	LSD	77,9	68	90	9,91		LSD	20,5	17	23	6,44
	RST	73,5	48	104	14,98		RST	20,6	10	29	10,62
2	LP	8,6	6	13	20,95	6	LP	7,5	6	10	12,50
	LR	8,9	6	10	12,84		LR	6,5	5	9	19,01
	LZ	8,8	6	13	22,15		LZ	6,4	4	9	15,13
	LT	9,2	7	12	13,55		LT	7,7	6	10	11,39
	LSD	8,6	6	11	13,40		LSD	6,6	5	8	10,31
	RST	8,8	6	14	18,14		RST	7,5	5	10	16,18
3	LP	21,2	18	25	8,25	7	LP	7,6	6	10	12,27
	LR	20,4	18	24	8,91		LR	7,1	5	9	18,22
	LZ	21,6	19	25	7,43		LZ	7,3	5	8	10,88
	LT	21,8	19	25	7,17		LT	7,9	7	10	11,90
	LSD	20,6	17	27	11,86		LSD	7,2	6	9	11,58
	RST	20,8	8	26	9,89		RST	8,4	4	67	75,61
4	LP	9,9	7	14	23,48						
	LR	9,4	7	12	13,10						
	LZ	10,4	6	14	20,96						
	LT	10,4	7	18	19,00						
	LSD	9,0	6	12	17,66						
	RST	9,4	1	13	18,53						

Symbole subpopulacji takie jak w tab. 1, spis cech – patrz tab. 2.

Symbols of the subpopulations the same as in tab. 1, list of traits – see tab. 2.

Zakątek (LZ). Z kolei najwięcej ząbków występujących na długości 2 mm na prawym brzegu igły (cecha 7) oznaczono u sosen z Rezerwatu Sosny Taborskiej (RST), a najmniej z Leśnictwa Ruś (LR).

Badania z 1994 roku (Bobowicz, Korczyk 1994) wykazały, że polskie populacje niżowe sosny zwyczajnej posiadają igły o długości od 48,2 mm dla populacji z Miłomłyna do 68,3 mm dla populacji z Bolewic. Analizując inne populacje stwierdzono, że u sosen z Borów Tucholskich występują nawet krótsze igły, o długości 30,3 mm (Urbaniak et al. 2003).

Analiza igieł wykonana dla doświadczenia proveniencyjnego IUFRO 1982 w Kórniku, gdzie w wyrównanych

warunkach siedliskowych rosły proveniencje sosen z Niemiec, Rosji, Szwecji, Łotwy, Belgii, Słowacji, Francji, Węgier, Bośni, Czarnogóry, Turcji i Polski wykazała, że sosna z Miłomłyna charakteryzowała się jednymi z najdłuższych igieł (83,4 mm), dużą liczbą ząbków na 2 mm na lewym (7,6) i prawym (7,6) brzegu igły, średnią liczbą rzędów aparatów szparkowych na wypukłej i płaskiej stronie igły (odpowiednio 13,5 i 12,8) oraz średnią liczbą aparatów szparkowych na wypukłej i płaskiej stronie igły na jednostkę długości (odpowiednio 23,3 i 23,1) spośród badanych proveniencji (Androsiuk et al. 2011). Natomiast badania nad rodami sosny z 8 polskich proveniencji (Miłomłyn,

Ruciane, Supraśl, Janów Lubelski, Gubin, Rychtal, Bolewice i Spała) uprawianymi na powierzchni w Sękocinie wykazały, że sosna z Miłomłyna odznaczała się krótszymi igłami (71,59 mm), mniejszą liczbą rzędów aparatów szparkowych na wypukłej i płaskiej stronie igły (odpowiednio 9,05 i 11,45) oraz większą liczbą aparatów szparkowych na wypukłej i płaskiej stronie igły na jednostkę długości (odpowiednio 23,86 i 22,68) w porównaniu z innymi badanymi proveniencjami (Bobowicz et al. 1995). Analiza tych samych proveniencji uprawianych na powierzchni w Miłomłynie wykazała, że sosna z proveniencji Miłomłyn cechowała się dłuższymi igłami (79,78 mm), większą liczbą rzędów aparatów szparkowych na wypukłej i płaskiej stronie igły (odpowiednio 10,52 i 12,75) oraz mniejszą liczbą aparatów szparkowych na wypukłej i płaskiej stronie igły na jednostkę długości (odpowiednio 20,12 i 20,11) w porównaniu z drzewami uprawianymi na powierzchni w Sękocinie (Breninek 1995). Podobna sytuacja (czyli wspomniane wyżej odrębne wartości cech drzew z proveniencji Miłomłyn uprawianych na powierzchniach w Miłomłynie i Sękocinie) występuje dla innych proveniencji (Breninek 1995). Badania przeprowadzone przez Bobowicz i Korczyka (1994) dla tych samych populacji, ale nie rosnących w wyrównanych warunkach uprawy wykazały, że populacja z Miłomłyna charakteryzowała się najkrótszymi igłami (48,18 mm) oraz średnią liczbą rzędów aparatów szparkowych na wypukłej i płaskiej stronie igły (odpowiednio 10,55 i 9,94) oraz mniejszą liczbą aparatów szparkowych na wypukłej i płaskiej stronie igły na jednostkę długości (odpowiednio 21,07 i 21,33) w porównaniu z pozostałymi 7 populacjami. Należy zaznaczyć, że długość igły jest cechą fenotypową dziedziczną wielogenowo (Szyp-Borowska et al. 2011; Nowicka et al. 2013) i podlegającą silnym wpływom środowiska. Odziedziczalność tej cechy obliczona dla populacji z Miłomłyna dla uprawy w Miłomłynie wyniosła 0, a dla uprawy w Sękocinie 0,31 (Bobowicz et al. 2007). Poza tym cecha ta jest ważnym wskaźnikiem zanieczyszczeń oraz zmian warunków siedliskowych i klimatycznych występujących na danym terenie (Chudzińska et al. 2014). Dlatego ważne jest badanie cech igieł cyklicznie, jako że igły stanowią aparat asymilacyjny rośliny, a w związku z tym decydują o potencjale wzrostowym i reprodukcyjnym drzew. Dlatego też poznanie zakresu tej cechy pozwala ocenić zdolności adaptacyjne gatunku.

Obecne badania dotyczące sosny taborskiej rosnącej w jej naturalnym siedlisku nieopodal Miłomłyna wykazały, że sosny z tej lokalizacji posiadają dłuższe igły (73,1 mm) niż w poprzednich badaniach w tej samej lokalizacji (Bobowicz, Korczyk 1994). Wskazuje to, iż warunki klimatyczne (łagodne i krótkie zimy, większa liczba opadów), mają duży wpływ na rozwój aparatu asymilacyjnego, a przez to decydują o dobrej produktywności sosny taborskiej.

Najmniejszą zmiennością charakteryzowały się cechy, poprzez które opisano liczby aparatów szparkowych po obu stronach igieł – średnio na 2 mm długości igły po jej płaskiej stronie było ich 21 a po wypukłej 20,8. Na tle innych polskich

niżowych populacji sosny taborskiej na 2 mm długości określonych rzędów na płaskiej i wypukłej stronie igieł posiadają znacznie mniej aparatów szparkowych. Północnopolska, mazurska populacja Ruciane posiada ich 28,2 i 28,1, a populacje z Borów Tucholskich: 24,4–25,4 (płaska strona igieł), 24,5–26,2 (wypukła strona igieł). Zbliżoną, mniejszą ich liczbę posiadają populacje ze wschodnio- i północnoeuropejskiej części zasięgu np. z Rosji (Tobolsk) – 21,8 i 21,5, z Finlandii (Inari) – 22,9 i 22,8. Także u sosen z pogórza niemieckiego obserwuje się niewielką liczbę aparatów szparkowych występujących na 2 mm długości – Elmstein, Niemcy (21,9 i 21,5) (Urbaniak 1998; Urbaniak et al. 2003; Urbaniak et al. 2006). Współczynniki odziedziczalności obliczone dla tych cech dla proveniencji Miłomłyn u drzew z uprawy w Sękocinie wynoszą dla liczby aparatów szparkowych na wypukłej stronie igły 0,642 a dla liczby aparatów szparkowych na płaskiej stronie igły 0,777. Znacznie mniejszą odziedziczalnością charakteryzowały się te cechy dla uprawy w Miłomłynie (0 i 0,176 odpowiednio) (Bobowicz et al. 2007). Aparaty szparkowe lokują się u tych sosen w mniejszej liczbie rzędów (8,8 i 9,6) niż u części niżowych populacji. We wschodniej Polsce w Janowie Lubelskim obserwowano 10,26 i 11,46 rzędów aparatów szparkowych na płaskiej i wypukłej stronie igły, w zachodniej Polsce, Bolewice – 10,51 i 11,33 (Urbaniak 1998). Współczynniki odziedziczalności obliczone dla liczby rzędów aparatów szparkowych wskazują na sytuację odwrotną dla proveniencji Miłomłyn. U drzew na uprawach w Sękocinie są one mniejsze niż u osobników w Miłomłynie i wynoszą dla liczby rzędów aparatów szparkowych na wypukłej stronie igły 0 a dla liczby rzędów aparatów szparkowych na płaskiej stronie igły 0,095. Natomiast dla uprawy w Miłomłynie (0,156 i 0,111 odpowiednio) (Bobowicz et al. 2007).

W celu stwierdzenia czy występują różnice między średnimi cech igieł poszczególnych osobników sosny obliczono rozkład F . Wyniki testowania przedstawiono w tabeli 4, z której wynika, że 30 badanych drzew jest zróżnicowanych pod względem zakresu zmienności wszystkich 7 cech, a cechami najsilniej różniącymi drzewa w populacji z Miłomłyna były: długość igły (cecha 1), liczba ząbków na 2 mm na lewym brzegu igły (cecha 7) oraz liczba rzędów aparatów szparkowych występujących po stronie wypukłej igły (cecha 4). Najmniej badane osobniki różniła liczba aparatów szparkowych przypadających na 2 mm długości igły po stronie płaskiej (cecha 3) i wypukłej (cecha 5). Dodatkowo, aby określić poziom wewnętrznego zróżnicowania populacji obliczono wskaźnik λ Wilksa (tab. 4). Im ta wartość jest bliższa zeru, tym populacja jest silniej zróżnicowana, im bliższa wartości 1, tym zróżnicowanie populacji jest mniejsze. Wyliczony wskaźnik λ Wilksa wynosi 0,0428 co wskazuje na znaczne, istotne zróżnicowanie analizowanych cech wśród 30 badanych osobników.

Graficznie wykrytą zmienność wewnątrz badanej populacji sosny przedstawiono na dendrogramie zbudowanym metodą UPGMA na odległościach Mahalanobisa (ryc. 2a). Na rycinie widać podział drzew na dwie grupy: pierwszą z drzewami nr: 17, 15, 19, 12, 18, 22, 20, 21, 9, 23 i 8 oraz drugą

Tabela 4. Wynik jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla badanych 7 cech igieł sosny zwyczajnej z Miłomłyna. * – wartość statystycznie istotna na poziomie $\alpha=0,001$.**

Table 4. The result of one-way analysis of variance (ANOVA) for 7 studied needles traits of Scots pine from Miłomłyn. *** – significant value at level $\alpha=0,001$.

Cecha / Trait	Statystyka F / F statistics
1	14,42***
2	6,25***
3	2,82***
4	6,80***
5	4,00***
6	6,62***
7	6,83***
Ogółem / Total	λ Wilks
	0,0428***

Spis cech – patrz tab. 2.

List of traits – see tab. 2.

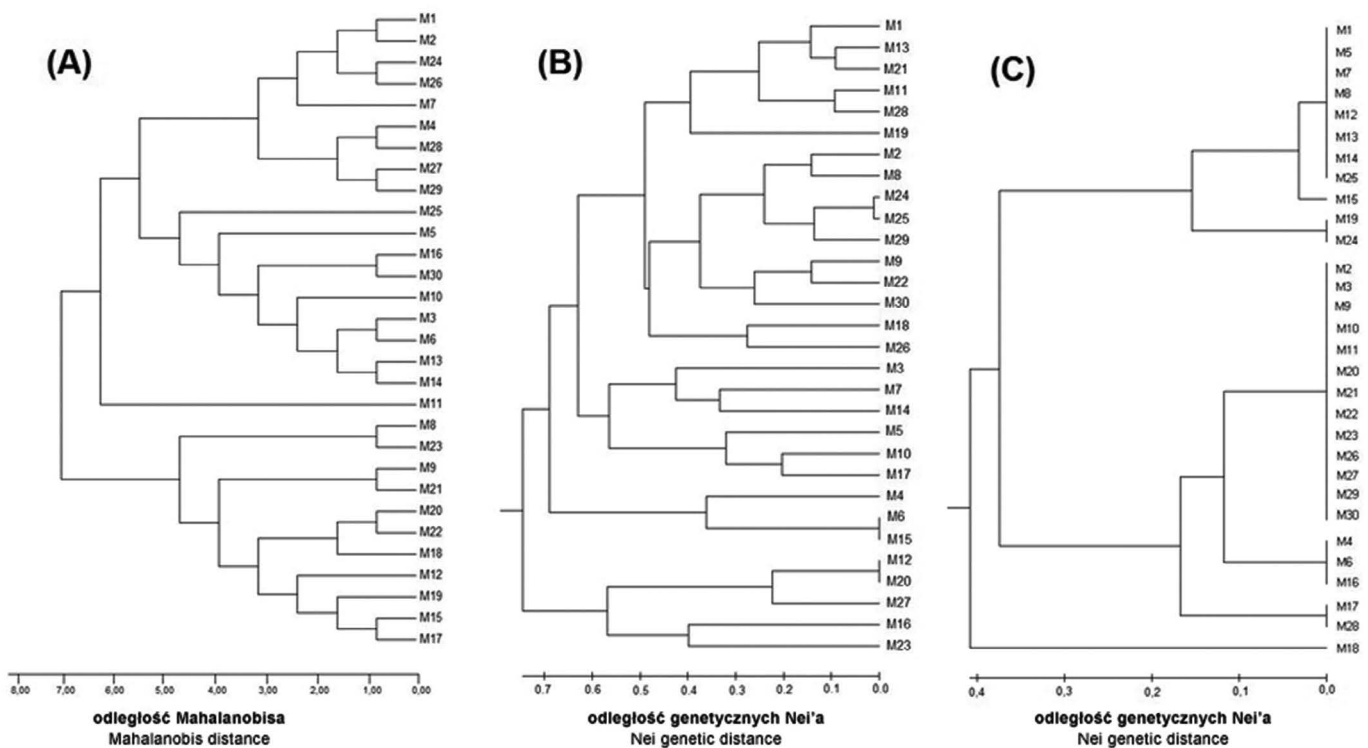
z pozostałymi drzewami. Druga grupa dzieli się na dwie podgrupy: do pierwszej należą drzewa nr: 14, 13, 6, 3, 10, 30, 16, 5 i 25, a do drugiej drzewa nr: 29, 27, 28, 4, 7, 26, 24, 2 i 1. Swoją indywidualny charakter wykazuje drzewo nr 11. Uzyskany obraz zmienności nie odzwierciedla podziału drzew na subpopulacje.

Obliczone pomiędzy badanymi cechami współczynniki korelacji Pearsona wskazują, że największe wprost proporcjonalne zależności statystycznie istotne ($p<0.05$) występują kolejno pomiędzy cechami: 6 a 7, 2 a 4, 3 a 5, 1 a 2 oraz 3 a 4 (tab. 5).

Analiza markerów molekularnych

Genom jądrowy

Populacje sosny zwyczajnej na terenie Polski północno-wschodniej wykształciły wartościowe ekotypy. Udowodniono to w badaniach porównawczych, jakimi są doświadczenia proveniencyjne. Przyczyną wyjątkowości populacji tego regionu badacze doszukują się w historii gatunku i dynamicznym środowisku, gdzie zmienny klimat i konkurencja innych gatunków wywierały określoną presję selekcyjną. Zatem należałoby oczekiwać, iż sosna zwyczajna z tego regionu powinna cechować się wysoką zmiennością genetyczną



Rycina 2. Dendrogram 30 drzew sosny zwyczajnej z Miłomłyna zbudowany metodą UPGMA, (A) na podstawie odległości Mahalanobisa dla danych z pomiaru 7 cech morfologicznych igieł, (B) na podstawie odległości genetycznych Nei'a dla danych z analizy loci jądrowego DNA, (C) na podstawie odległości genetycznych Nei'a dla danych z analizy loci chloroplastowego DNA

Figure 2. Dendrogram of 30 Scots pine trees from Miłomłyn constructed used the UPGMA method, (A) on the basis of Mahalanobis distances for 7 morphological needles traits, (B) on the basis of Nei genetic distances for nuclear DNA loci, (C) on the basis of Nei genetic distances for chloroplast DNA loci

Tabela 5. Współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy 7 morfologicznymi cechami igieł sosny zwyczajnej z Miłomłyna.

Table 5. Pearson correlation coefficients between 7 morphological needles traits of Scots pine from Miłomłyn.

1							
2	0,49**						
3	0,16	0,18					
4	0,32	0,76**	0,46*				
5	-0,04	0,32	0,51**	0,36			
6	0,05	-0,01	0,11	-0,13	0,14		
7	0,19	-0,02	0,20	-0,10	0,16	0,88**	
	1	2	3	4	5	6	7

* – wartość statystycznie istotna na poziomie $\alpha=0,05$; ** – wartość statystycznie istotna na poziomie $\alpha = 0,01$.* – significant value at level $\alpha=0,05$; ** – significant value at level $\alpha=0,01$.

Spis cech – patrz tab. 2.

List of traits – see tab. 2.

z jednej strony, ale również populacje te powinny znajdować się w równowadze Hardy’ego-Weinberga. Innymi słowy, powinny charakteryzować się homeostazą genetyczną najkorzystniejszą w danych warunkach. Wydaje się, że warunki te spełnia populacja sosny taborskiej z Nadleśnictwa Miłomłyn. W prezentowanych wynikach wskazano na znaczący poziom jej genetycznej zmienności.

Wśród 30 badanych osobników wykryto 30 różnych genotypów, a więc żaden z nich się nie powtarzał. Znalezione od 7 do 20 alleli na locus (tab. 6). Największą liczbę wykryto dla locus SPAG7.14 (20) a najmniejszą dla PtTX3107 oraz PtTX4011 (7). Średnio dla populacji wykryto 12,4 allele w locus. Największą efektywną liczbę alleli wykryto dla locus SPAG7.14 (15,79) a najmniejszą dla PtTX4011 (2,86), średnio dla populacji 7,78. Najczęstsze allele dla poszczególnych loci to: dla PtTX3107 allel 161 (frekwencja 33%), dla PtTX3116 allel 157 (37%), dla PtTX4001 allel 214 (38%), dla PtTX4011 allel 257 (53%), dla SPAG7.14 allel 217 (10%), dla SPAC11.4 allel 134 (15%) i dla locus SPAC12.5 allel 139 (18%). Nowakowska (2007) analizowała 42 polskie populacje sosny zwyczajnej, w tym populację z Miłomłyna. Badała ona 4 loci jądrowe, w tym dwa te same co w niniejszej pracy (SPAG7.14 i SPAC12.5) i wykryła, że najczęściej występował allel 199 i 221 dla locus SPAG7.14, a dla locus SPAC12.5 allel 155, 161 i 139. Ogólnie dla locus SPAG7.14 wykryła 14 alleli, a 11 alleli dla locus SPAC12.5, a więc mniej niż w niniejszych badaniach. Podobną jak w naszych analizach liczbę alleli w locus dla loci SPAG7.14 i SPAC12.5, odpowiednio 20 i 19, wykryto dla osobników sosny z drzewostanu w Oławie (Nowakowska et al. 2014),

natomiast znacznie mniej alleli (od 6 do 15) wykryto dla populacji włoskich z południowego krańca zasięgu występowania sosny (Scalfi et al. 2009).

Populacja z Miłomłyna dla wszystkich badanych loci była w równowadze Hardy’ego-Weinberga. Zanotowano jednak deficyt heterozygot, największy dla locus PtTX4011 ($F_{IS}=0,282$), a najmniejszy dla PtTX4001 ($F_{IS}=0,004$), a współczynnik wsobności wynosił średnio 0,106. Korekta wyników współczynnika wsobności F_{IS} o obecność alleli zerowych (Chybicki, Burczyk 2009) nie wykazała istotnych odstępstw od wyników pierwotnych (średnia wartość F_{IS} po korekcie 0,101). Deficyt heterozygot może być wynikiem kilku czynników, wśród których szczególną uwagę należy zwrócić na kojarzenie krewniacze lub występowanie podstruktur w populacji. Największą heterozygotyczność obserwowaną wykryto dla locus SPAC11.4 (0,87), najmniejszą dla locus PtTX4011 (0,47), a średnio dla wszystkich loci wynosiła ona 0,73. Heterozygotyczność oczekiwana była wyższa niż obserwowana i średnio dla populacji wynosiła 0,82. Nowakowska (2007) dla SPAG7.14 wykryła heterozygotyczność oczekiwaną (0,924) wyższą niż obserwowaną (0,800) i sytuację odwrotną dla locus SPAC12.5 (odpowiednio 0,910 i 1,000). Średnio dla wszystkich 4 analizowanych loci wykryła niewielki nadmiar heterozygot (heterozygotyczność oczekiwana wynosiła 0,803, a obserwowana 0,844). Jednak badana populacja była w równowadze Hardy’ego-Weinberga. Populacja ta należy do krainy bałtyckiej, dla której Nowakowska (2007) wykryła największe zróżnicowanie w porównaniu z pięcioma innymi badanymi krainami polskimi. Inne badania nad sosną wskazywały na wyższą wartość heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej (odpowiednio 0,84 i 0,85), które zanotowano dla dorosłych osobników sosny z Nadleśnictwa Oława oraz na niższą wartość współczynnika wsobności (0,011) (Nowakowska et al. 2014). Natomiast populacje włoskie z krańca zasięgu wykazywały podobną średnią wartość heterozygotyczności obserwowanej (0,81), jednak dla poszczególnych populacji wahała się ona od 0,74 do 0,91. Populacje te charakteryzowały się wyższą średnią wartością współczynnika wsobności (0,16), która dla poszczególnych populacji wahała się od 0,125 do 0,212 (Scalfi et al. 2009).

Na podstawie odległości genetycznych Nei’a skonstruowano dendrogram metodą UPGMA (ryc. 2b). Z rysunku wynika, że drzewa tworzą cztery grupy. Pierwszą z osobnikami nr: 23, 16, 27, 20 i 12, drugą z: 15, 6 i 4, trzecią z 17, 10, 5, 14, 7 i 3. Czwarta największa grupa dzieli się na dwie podgrupy: pierwszą z drzewami nr 26, 18, 30, 22, 9, 29, 25, 24, 8 i 2 oraz drugą mniejszą z osobnikami 19, 28, 11, 21, 13 i 1. Należy zwrócić uwagę na fakt, że drzewa pochodzące z terenu Rezerwatu „Sosny Taborskie” należą głównie do grupy pierwszej i czwartej, natomiast sosny pochodzące z terenów przyległych do obszaru rezerwatu, na omawianym dendrogramie, zawarte są w grupie drugiej i trzeciej. Niemniej każda z wyróżnionych grup zawiera drzewa z odrębnych subpopulacji. Zapewne jest to konsekwencja wspólnej puli genetycznej sosny zwyczajnej skupionej w tym regionie.

Tabela 6. Statystyczne parametry zmienności genetycznej. Oznaczenia: N – wielkość próby, N_A – liczba alleli w locus, N_E – liczba efektywnych alleli w locus, H_O – heterozygotyczność obserwowana, H_E – heterozygotyczność oczekiwana, F_{IS} – współczynnik wsobności, HWE – odchylenie od równowagi Hardy’ego-Weinberga, AZ – średnia liczba alleli zerowych, h – współczynnik zróżnicowania genetycznego

Table 6. Statistic parameters of genetic diversity. Symbols: N – sample size, N_A – number of alleles per locus, N_E – number of effective alleles per locus, H_O – observed heterozygosity, H_E – expected heterozygosity, F_{IS} – fixation index, HWE – deviation from Hardy-Weinberg equilibrium AZ – mean number of null alleles, h – diversity index

Locus	nrSSR								Locus	cpSSR		
	N	N_A	N_E	H_O	H_E	F_{IS}	HWE	AZ		N_A	N_E	h
PtTX3107	30	7	4,749	0,700	0,789	0,113	ns	0,00	Pt71987	2	1,385	0,278
PtTX3116	30	8	3,797	0,667	0,737	0,095	ns	0,00	PCP45071	6	3,169	0,684
PtTX4001	30	10	4,348	0,767	0,770	0,004	ns	0,00	Pt45002	4	1,619	0,382
PtTX4011	30	7	2,857	0,467	0,650	0,282	ns	0,00	Pt30204	5	3,383	0,704
SPAG7.14	30	20	15,789	0,833	0,937	0,110	ns	0,00	Pt71936	3	1,718	0,418
SPAC11.4	30	16	11,392	0,867	0,912	0,050	ns	0,00	PCP1289	4	2,356	0,576
SPAC12.5	30	19	11,465	0,833	0,913	0,087	ns	0,00	PCP41131	2	1,220	0,180
									PCP30277	4	3,689	0,729
Średnia									Średnia			
Mean	30,000	12,429	7,771	0,733	0,815	0,106	ns	0,00	Mean	3,75	2,317	0,494
SE	0,000	2,170	1,901	0,052	0,041	0,033			SE	0,49	0,345	0,074

ns – wartość nieistotna statystycznie, SE – błąd standardowy średniej

ns – not significant value, SE – standard error of the mean

Tabela 7. Statystyczne parametry zmienności genetycznej i morfologicznej (λ Wilksa) w poszczególnych subpopulacjach. Oznaczenia takie jak w tab. 6. * – wartość statystycznie istotna na poziomie $\alpha=0,001$**

Table 7. Statistic parameters of genetic and morphological (Wilks λ) diversity in particularly subpopulations. Symbols the same like in tab. 6. *** – significant value at level $\alpha=0,001$

Subpopulacja/ Subpopulation	N	nrSSR					cpSSR			Igły Needles	λ Wilksa
		N_a	N_e	H_o	H_e	F	N_a	N_e	h		
LP	3,000	4,143	3,696	0,810	0,698	-0,150	1,875	1,700	0,583	0,098***	
LR	2,000	3,286	3,124	0,857	0,625	-0,371	1,750	1,750	0,750	0,150***	
LZ	3,000	4,000	3,504	0,619	0,659	0,027	1,750	1,600	0,500	0,048***	
LT	3,000	4,143	3,592	0,857	0,683	-0,262	1,750	1,650	0,458	0,386	
LSD	2,000	3,286	3,048	0,786	0,661	-0,181	1,500	1,500	0,500	0,253**	
RST	17,000	10,000	7,324	0,697	0,799	0,133	3,375	2,311	0,525	0,058***	

Genom chloroplastowy

Dla genomu chloroplastowego wykryto 28 haplotypów, a haplotyp 130/170/189/160/164/124/157/154 wystąpił u 3 osobników (nr 21, 23 i 26) rosnących w Rezerwacie Sosny Taborskiej w Leśnictwie Tabórz. Znaleziono od 2 do 6 alleli na locus (tab. 3). Największą liczbę wykryto dla locus PCP45071, a najmniejszą dla Pt71987 oraz PCP41131. Średnio dla populacji wykryto 3,8 allele w locus, wartość

ta jest porównywalna z wynikami otrzymanymi dla dwunastu populacji sosny zwyczajnej z Bułgarii (Naydenov et al. 2005) (3,6 allele). Największą efektywną liczbę alleli wykryto dla locus PCP30277 (3,69), a najmniejszą dla PCP41131 (1,22), średnio dla populacji 2,32. We włoskich populacjach ze skraju zasięgu wykryto od 4 do 5 alleli na analizowanych od 12 do 19 osobników. Badano jednak tylko dwa loci: Pt30204 i Pt71936 i w sumie wykryto od 7

do 10 różnych haplotypów, średnio 8,25 (Scalfi et al. 2009). Dla osobników z Miłomłyna największe wartości współczynnika zróżnicowania genetycznego wykryto dla locus PCP30277 (0,73), najmniejsze dla locus PCP41131 (0,18), a średnio dla wszystkich loci 0,49. Wartość współczynnika zróżnicowania genetycznego dla całej populacji obliczona na podstawie częstości haplotypów wynosiła 0,96 i była wyższa niż średnia wartość tego współczynnika dla populacji włoskich (0,92, a w poszczególnych populacjach wahała się od 0,88 do 0,95) (Scalfi et al. 2009) oraz dla reliktowych populacji szkockich sosny kaledońskiej (0,91) (Provan et al. 1998). Na wysokość tego parametru u sosny kaledońskiej znaczny wpływ miała liczba alleli unikatowych, średnio 19 w populacji (Provan et al. 1998). W badaniach prowadzonych przez Naydenova i in. (2005) obserwowano podobną liczbę alleli na locus, co w prezentowanych wynikach. Dla locus Pt45002 znaleziono 6 wariantów długości, w zakresie od 167 do 172, różniących się od siebie o jeden nukleotyd, dla locus Pt30204 znaleziono 8 różnej długości fragmentów, których zakres mieścił się w przedziale od 137 do 144. W niniejszej pracy analizowane loci mieściły się w zakresie 187–190 oraz 157–162, odpowiednio dla locus Pt45002 i Pt30204. Porównanie długości amplifikowanego DNA z populacjami bułgarskimi z południowego krańca zasięgu wskazuje, iż populacja sosny taborskiej może reprezentować drzewa o odmiennej historii ewolucyjnej.

Na podstawie odległości genetycznych Nei' a skonstruowano dendrogram metodą UPGMA (ryc. 2c). Z rysunku wynika, że drzewa tworzą dwie grupy z podgrupami. Pierwsza grupa dzieli się na dwie podgrupy, mniejszą z drzewami nr: 16, 6 i 4 oraz większą z drzewami: 30, 29, 27, 26, 23, 22, 21, 20, 11, 10, 9, 3 i 2. Do tych dwóch podgrup przyłączają się drzewa 17 i 28. Druga grupa również dzieli się na dwie podgrupy: pierwszą stanowią dwa osobniki: 19 i 24, a drugą: 25, 14, 13, 12, 8, 7, 5 i 1. Do tej podgrupy przyłącza się drzewo nr 15. Drzewo nr 18 najbardziej różni się pozostałych drzew, co potwierdza największa odległość Nei' a widoczna na rysunku.

Badania nad zróżnicowaniem wewnątrzpopulacyjnym na podstawie polimorfizmów sekwencji DNA wskazują na znaczne różnice w obrębie poszczególnych populacji. Znacznie mniejszy zakres zmienności jest ułożony między populacjami. Jednym z promotorów zmian genetycznych populacji z obszaru zasięgu ciągłego, co ma miejsce na niżu polskim, jest sama struktura zasiedlenia tego terenu. Jest to obszar o wyraźnie ciągłym zasięgu sosny zwyczajnej. Ułatwia to znacząco powstawanie lokalnych adaptacji (Holt, Gomulkiewicz 1997; Lenormand 2002). Populacje z tego regionu geograficznego są szczególnie zróżnicowane genetycznie na tle porównywanych populacji sosny zwyczajnej z innych regionów kraju (Nowakowska 2007; Nowakowska et al. 2014) i Europy (Scalfi et al. 2009). Są to tereny, na których pozostały obszary leśne ze stosunkowo ograniczonym wpływem działalności człowieka, a wiek badanych drzew od 240 do 280 lat wydaje się być gwarantem ich rodzimości.

Zmienność pomiędzy subpopulacjami oraz porównanie zmienności wykrytej różnymi markerami

Dodatkowo określono zmienność pomiędzy subpopulacjami sosny z Nadleśnictwa Miłomłyn (tab. 7). I tak dla cech igieł największą zmiennością (najmniejszą wartością λ Wilksa) charakteryzowała się sosna z Leśnictwa Zakątek (LZ), a najmniejszą z Leśnictwa Tabórz (LT). Za pomocą loci chloroplastowych największą zmienność (h) wykryto dla sosny z Leśnictwa Ruś, a najmniejszą (podobnie jak dla markera morfologicznego) z Leśnictwa Tabórz (LT). Za pomocą loci jądrowych największą zmienność (Ho) wykryto dla sosny z Leśnictwa Ruś i Leśnictwa Tabórz (LT), a najmniejszą z Leśnictwa Zakątek (LZ). Obliczono również współczynnik korelacji Pearsona pomiędzy tymi trzema parametrami zmienności dla poszczególnych subpopulacji i wykryto, że słaba pozytywna korelacja występuje pomiędzy wskaźnikiem h dla loci chloroplastowych oraz λ Wilksa dla cech fenotypowych ($r=0,31$; $p=0,550$), a silna negatywna korelacja pomiędzy heterozygotycznością obserwowaną (Ho) a λ Wilksa ($r=-0,67$; $p=0,141$). Porównując wskaźniki zmienności dla markerów molekularnych wykryto słabą pozytywną korelację występującą pomiędzy wskaźnikiem h dla loci chloroplastowych oraz heterozygotycznością obserwowaną (Ho) dla loci jądrowych ($r=0,39$; $p=0,447$).

Obliczono również odległości genetyczne i biologiczne pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami (tab. 8). Wykryto dla cech igieł, że najbardziej różnią się od siebie sosny z Leśnictwa Perskie (LP) i z Leśnictwa Sarni Dół (LSD) oraz z Leśnictwa Tabórz (LT) i z Leśnictwa Sarni Dół (LSD), a najmniej Leśnictwa Perskie (LP) i Leśnictwa Tabórz (LT) oraz Leśnictwa Tabórz (LT) i Rezerwatu Sosny Taborskiej (RST). Dla loci chloroplastowych najbardziej różnią się sosny z Leśnictwa Perskie (LP) i z Leśnictwa Zakątek (LZ) oraz, podobnie jak przy cechach fenotypowych, z Leśnictwa Perskie (LP) i z Leśnictwa Sarni Dół (LSD), a najmniej z Leśnictwa Ruś (LR) i z Leśnictwa Tabórz (LT) oraz, podobnie jak przy cechach igieł, z Leśnictwa Tabórz (LT) i Rezerwatu Sosny Taborskiej (RST). Dla loci jądrowych najbardziej różnią się Leśnictwo Perskie (LP) i Leśnictwo Ruś (LR) oraz Leśnictwo Zakątek (LZ) i Leśnictwo Sarni Dół (LSD), a najmniej Leśnictwo Zakątek (LZ) i Rezerwat Sosny Taborskiej (RST), Leśnictwo Perskie (LP) i Leśnictwo Zakątek (LZ), Leśnictwo Perskie (LP) i Rezerwat Sosny Taborskiej (RST) oraz Leśnictwo Tabórz (LT) i Rezerwat Sosny Taborskiej (RST). Ogólnie można przyjąć na podstawie wszystkich trzech badanych markerów, że sosny z Leśnictwa Tabórz (LT) i Rezerwatu Sosny Taborskiej (RST) są najbardziej do siebie podobne, co jest spowodowane zapewne największym przepływem genów pomiędzy tymi subpopulacjami, które geograficznie rosną najbliżej siebie.

Zaznaczyć jednak trzeba, że 5 subpopulacji miało liczebność od 2 do 3 osobników, co nie daje miarodajnej próby populacyjnej. Dlatego też w przedstawianej pracy wyniki dotyczące całej populacji z Nadleśnictwa Miłomłyn, liczącej 30 drzew, wydają się odzwierciedlać jej strukturę genetyczną.

Tabela 8. Obliczone biologiczne i genetyczne odległości pomiędzy subpopulacjami.

Table 8. Calculated biological and genetic distances between subpopulations.

a) odległości Mahalanobisa dla cech morfologicznych igieł
Mahalanobis distances for morphological traits of needles

LP	LR	LZ	LT	LSD	RST	
0,000						LP
1,660	0,000					LR
1,499	1,529	0,000				LZ
0,765	1,694	1,344	0,000			LT
1,805	1,392	1,046	1,699	0,000		LSD
1,073	1,280	1,336	0,885	1,101	0,000	RST

b) odległości genetyczne Nei'a dla markerów chloroplastowych
Nei genetic distances for chloroplast markers

LP	LR	LZ	LT	LSD	RST	
0,000						LP
0,254	0,000					LR
0,394	0,342	0,000				LZ
0,237	0,122	0,178	0,000			LT
0,390	0,254	0,229	0,178	0,000		LSD
0,157	0,140	0,242	0,127	0,173	0,000	RST

c) odległości genetyczne Nei'a dla markerów jądrowych
Nei genetic distances for nuclear markers

LP	LR	LZ	LT	LSD	RST	
0,000						LP
0,990	0,000					LR
0,367	0,838	0,000				LZ
0,444	0,728	0,467	0,000			LT
0,688	0,552	1,001	0,544	0,000		LSD
0,369	0,690	0,336	0,374	0,663	0,000	RST

Symbole subpopulacji takie jak w tab. 1.

Symbols of the subpopulations the same as in tab. 1.

4. Wnioski

Zidentyfikowano znaczną zmienność cech morfologicznych igieł u sosny taborskiej z Nadleśnictwa Miłomłyn: największą dla długości igieł (śr. 73.1 mm), a najmniejszą dla liczby aparatów szparkowych występujących na 2 mm długości w rzędach (średnio 21 na 2 mm po płaskiej i 20.8 po wypukłej stronie igły).

Ujawniono znaczne zróżnicowanie genetyczne badanej populacji. Każde z drzew posiadało odrębny genotyp opisany na podstawie zestawu 7 loci genomu jądrowego. Dla wszystkich badanych loci populacja znajdowała się w równowadze Hardy'ego-Weinberga. Na podstawie analizy polimorfizmu 8 loci z genomu chloroplastowego wykryto 28 haplotypów, a współczynnik zróżnicowania genetycznego wyniósł 0.96.

Analiza współczynnika korelacji Pearsona pomiędzy zbadanymi trzema parametrami zmienności dla poszczególnych subpopulacji wskazuje, że pomiędzy współczynnikiem zróżnicowania genetycznego (h) dla loci chloroplastowych oraz poziomem wewnętrznego zróżnicowania populacji (wskaźnik λ Wilksa) dla cech fenotypowych ($r=0,31$; $p=0,550$) występuje słaba korelacja pozytywna, a pomiędzy heterozygotycznością obserwowaną (H_o) a λ Wilksa ($r=-0,67$; $p=0,141$) – silna korelacja negatywna. Porównując wskaźniki zmienności dla markerów molekularnych stwierdzono słabą korelację pozytywną pomiędzy wskaźnikiem h dla loci chloroplastowych oraz heterozygotycznością obserwowaną (H_o) dla loci jądrowych ($r=0,39$; $p=0,447$).

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Podziękowania i źródła finansowania

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki jako projekt badawczy N N305 019140.

Literatura

- Androsiuk P., Kaczmarek Z., Urbaniak L. 2011. The morphological traits of needles as markers of geographical differentiation in European *Pinus sylvestris* populations. *Dendrobiology* 65:3–16.
- Auckland L. D., Bui T., Zhou Y., Shepherd M., Williams C. G. 2002. Conifer microsatellite handbook. Corporate Press, Raleigh, N.C.
- Bobowicz M. A., Korczyk A. F. 1994. Interpopulational variability of *Pinus sylvestris* L. in eight localities expressed in morphological and anatomical traits of needles. *Acta Societatis Botanico-rum Poloniae* 63(1): 67–76.
- Bobowicz M. A., Pawlaczyk E. M., Kaczmarek Z., Korczyk A. F. 2007. Odziedziczalność cech morfologicznych i anatomicznych igieł półrodzeństwa drzew doborowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). *Leśne Prace Badawcze* 3: 69–80.
- Bobowicz M. A., Pieczyńska B., Sufryd A., Breninek J., Korczyk A. F. 1995. Inter-provenance variability of half-sib Scots pine progenies in traits of needle morphology and anatomy. *Biological Bulletin of Poznań* 32: 43–57.
- Boratyński A. 1993. Systematyka i geograficzne rozmieszczenie, w: *Biologia sosny zwyczajnej* (red. Białobok S., Boratyński A., Bugała W.)] Wyd. Sorus PAN Poznań-Kórnik 1993: 45–69. ISBN: 83-85599-21-5.
- Breninek J. 1995. Rodowa i proveniencyjna zmienność sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. w cechach morfologii i anatomii igieł. Manuskrypt pracy doktorskiej dostępny w Zakładzie Genetyki UAM, Poznań.

- Cheddadi R., Vendramin G. G., Litt T. i in. 2006. Imprints of glacial refugia in the modern genetic diversity of *Pinus sylvestris*. *Global Ecology & Biogeography* 15:271–282. DOI: 10.1111/j.1466-8238.2006.00226.x.
- Chudzińska E., Pawlaczyk E. M., Celiński K., Diatta J. B. 2014. Response of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) to stress induced by different types of pollutants – testing the fluctuating asymmetry. *Water and Environment Journal* 28: 533–539. DOI: 10.1111/wej.12068.
- Chernyavskii M., Giertych M. 1982. Pol'skiye rasy sosny obyknovynnoi (*Pinus sylvestris* L.) v gyeografichyeskikh opytakh. Gyeografichyeyckye opyty v lesnoi syelyekcii. Pribaltika, Ryga, "Zinatne": 105–119.
- Chybicki I.J., Burczyk J. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity* 100: 106–113.
- Critchfield W.B., Little F., Jr E.L. 1966. Geographic Distribution of the Pines of the World. US Department of Agriculture, Forest Service, Miscellaneous Publication 991, Washington.
- Czerwiński A. 1993. Bory sosnowe i zbiorowiska leśne z udziałem sosny w Polsce. w: *Biologia sosny zwyczajnej* (red. Białobok S., Boratyński A., Bugała W.)] Wyd. Sorus PAN Poznań-Kórnik 1993: 282–300. ISBN: 83-85599-21-5.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Elsik C. G., Minihan V. T., Hall S. E., Scarpa A. M., Williams C. G. 2000. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome* 43, 3: 550–555. DOI: 10.1139/g00-002.
- Fabijanowski J. 1961. Kilka uwag o badaniach dotyczących ras sosny zwyczajnej w Polsce oraz o sośnie mazurskiej. *Sylwan* 105(4): 21–30.
- Giertych M. 1980. Polskie rasy sosny, świerka i modrzewia w międzynarodowych doświadczeniach proveniencyjnych. *Arboretum Kórnickie* 25: 135–160.
- Giertych M. 1986. Provenance variation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) on a 46-years old international experiment in Poland. *Arboretum Kórnickie* 31: 183–193.
- Giertych M. 1993. Zmienność proveniencyjna. w: *Biologia sosny zwyczajnej* (red. Białobok S., Boratyński A., Bugała W.)] Wyd. Sorus PAN Poznań-Kórnik 1993: 325–339. ISBN: 83-85599-21-5.
- Giertych M., Oleksyn J. 1992. Studies on genetic variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) coordinated by IUFRO. *Silvae Genetica* 41(2): 133–143.
- Hipkins V. D., Krutovskii K. V., Straws S. H. 1994. Organelle genomes in conifers: structure, evolution, and diversity. *Forest Genetics* 1(4): 179–189.
- Holt R. D., Gomulkiewicz R. 1997. How does immigration influence local adaptation? A re-examination of a familiar paradigm. *The American Naturalist* 149: 563–572.
- Korczyk A. F. 2002. Jakość hodowlana drzewostanów sosnowych oraz wartość hodowlana i genetyczna drzew doborowych i porównawczych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) ośmiu polskich pochodzeń. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa. Rozprawy i monografie*, 3: 1–125. ISBN 83-87647-26-8.
- Labra M., Grassi F., Sgorbati S., Ferrari C. 2006. Distribution of genetic variability in southern populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Alps to the Apennines. *Flora* 201: 468–476.
- Lenormand T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 183–189.
- Matras J. 1989. Badania proveniencyjne Zakładu Nasiennictwa i Selekcji IBL nad sosną zwyczajną. *Sylwan* 133 (11–12): 53–65.
- Naydenov K. D., Tremblay F. M., Alexandrov A., Fenton N. J. 2005. Structure of *Pinus sylvestris* L. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 1226–1245. DOI: 10.1016/j.bse.2005.07.011.
- Naydenov K., Senneville S., Beaulieu J., Tremblay F., Bousquet J. 2007. Glacial vicariance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from Scots pine for a complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and in Asia Minor. *BMC Evolutionary Biology* 7: 233–244. DOI: 10.1186/1471-2148-7-233.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283–292.
- Niedzielska B. 2001. Wiek sosen reliktowych na Sokolicy w Pienińskim Parku Narodowym. *Sylwan* 145(1): 57–62.
- Nowakowska J. A. 2007. Zmienność genetyczna polskich wybranych populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na podstawie analiz polimorfizmu DNA. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa, Rozprawy i monografie*, 9: 1–118. ISBN 978-83-878647-70-4.
- Nowakowska J. A., Zachara T., Konecka A. 2014. Zmienność genetyczna naturalnego odnowienia i drzewostanu macierzystego sosny (*Pinus sylvestris* L.) i świerka (*Picea abies* L. Karst.). *Leśne Prace Badawcze* 75(1): 47–54. DOI: 10.2478/frp-2014-0005.
- Nowicka A., Ukalska J., Simińska J., Szyp-Borowska I. 2013. Characterization and mapping of QTL used in breeding of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Folia Forestalia Polonica, series A Forestry*, 55 (4): 168–173 DOI: 10.2478/ffp-2013-0018.
- Peakall R., Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Pravdin L.F. 1964. Sosna obyknovennaja izmencivost vnutrividovaja sistemacka i selekcija (Scots pine, Variability, Systematics and Selection). Nauka, Moskwa.
- Provan J., Soranzo N., Wilson N. J., Menicol J. W., Forrest G. I., Cottrell J., Powell W. 1998. Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings of Royal Society of London Series B* 265: 1697–1705.
- Provan J., Soranzo N., Wilson N. J., Goldstein D. B., Powell W. 1999. A Low Mutation Rate For Chloroplast Microsatellites. *Genetics* 153: 943–947.
- Przybylski T. 1970. Zmienność sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) polskich proveniencji. Kórnik, Instytut Dendrologii i Arboretum PAN.
- Pyhäjärvi T., Salmela M.J., Savolainen O. 2008. Colonization routes of *Pinus sylvestris* inferred from distribution of mitochondrial DNA variation. *Tree Genetics & Genomes* 4: 247–254. DOI: 10.1007/s11295-007-0105-1.
- Rudin D., Lindgren D. 1977. Isozyme studies in seed orchards. *Studia Forestalia Suecica* 139: 1–23.
- Sánchez-Robles J. M., Balao F., García-Castaño J. L., Terrab A., Navarro-Sampedro L., Talavera S. 2012. Nuclear Microsatellite Primers for the Endangered Relict Fir, *Abies pinsapo* (Pinaceae) and Cross-Amplification in Related Mediterranean Species. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 14243–14250. DOI:10.3390/ijms131114243.
- Scalfi M., Piotti A., Rossi M., Piovani P. 2009. Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: the rear edge of the range. *European Journal of Forest Research* 128: 377–386. DOI: 10.1007/s10342-009-0273-7.

- Shen H.H., Rudin D., Lindgren D. 1981. Study of the pollination pattern in a Scots pine seed orchard by means of isozyme analysis. *Silvae Genetica* 30: 7–15.
- Sinclair W.T., Morman J.D., Ennos R.A. 1998. Multiple origins for Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Scotland: Evidence from mitochondrial DNA variation. *Heredity* 80(2): 233–240.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology* 7: 1247–1263.
- Soranzo N., Alia R., Provan J., Powell W. 2000. Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Molecular Ecology* 9: 1205–1211.
- Staszkiwicz J. 1970. Systematyka i zmienność. w: Sosna zwyczajna *Pinus sylvestris* L. (red. S. Białobok), Warszawa, Arboretum Kórnickie - Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- Szyp-Borowska I., Ukalska J., Simińska J. 2011. Markery RAPD sprzężone z genami cech ilościowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). *Leśne Prace Badawcze* 72 (3): 205–211. DOI: 10.2478/v10111-011-0020-y.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Urbaniak L. 1998. Zróżnicowanie geograficzne sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z terenu Eurazji na podstawie cech anatomicznych i morfologicznych igieł. Wydawnictwo Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza W Poznaniu Seria Biologia 58: 1–142. ISBN 82-232-0905-7, ISSN 0554-811X.
- Urbaniak L., Karliński L., Popielarz R. 2003. Variation of morphological needle characters of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in different habitats. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 72 (1): 37–44.
- Urbaniak L., Androsiuk P., Ślósarz M., Vončina G. 2006. Zróżnicowanie populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w Piecinach Właściwych na podstawie cech morfologicznych igieł. *Pieniny - Przyroda i Człowiek* 9: 71–78.
- Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 595–598.
- Yeh F. C. 2000. Population genetics. w: Young A, Boshier D, Boyle T (eds) Forest conservation genetics. CSIRO Publishing, CABI Publishing, Collingwood, Wallingford 21–37.
- Zhou Y., Bui T., Auckland L. D., Williams C. G. 2002. Undermethylated DNA as a source of microsatellites from a conifer genome. *Genome*. 45(1): 91–99.

Wkład autorów

P.L. – koncepcja badań, analizy genetyczne, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu; E.M.P – koncepcja badań, analizy genetyczne, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu; B.Ł. – opracowanie wyników, napisanie manuskryptu; L.U. – koncepcja badań, inwentaryzacja i zbiór materiału biologicznego, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu.