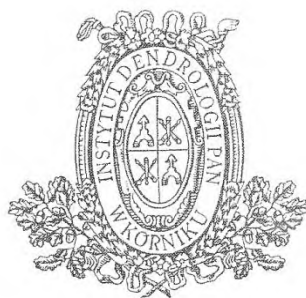


Anna Katarzyna Jasińska

**ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA *PINUS SYLVESTRIS* L.
NA TERENIE OSTOI FLOR TRZECIORZĘDOWYCH
W POŁUDNIOWEJ EUROPIE
I POŁUDNIOWO-ZACHODNIEJ AZJI**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Instytut Dendrologii
Polska Akademia Nauk



Kórnik 2011

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem promotora
Dr hab. Krystyny Boratyńskiej

Praca była finansowana przez MNiSW,
projekt badawczy numer N N303 360535.

Pracę dedykuję Babci Zosi i Dziadkowi Felkowi

Dziękuję Pani Dr hab. Krystynie Boratyńskiej
i Panu Prof. dr hab. Adamowi Boratyńskiemu
za możliwość pracy z nimi i za zaufanie jakim mnie obdarzyli.
Przez ostatnie lata stali się dla mnie kimś więcej niż tylko przełożonymi.

Dziękuję:

Mariuszowi

Mamie, Tacie, Piotrowi, Oli, Bogdanowi, Babci Lusi

Mamie i Tacie Grymaszewskim, Żanecie, Pawłowi i Miłoszowi

Danusi z Rodziną, Asi, Olkowi, Kasi i Bąkom

Panu Prof. dr hab. Jerzemu Zielińskiemu

Monice Dering

Karolinie Sobierajskiej, Joannie Pranczk, Dominikowi
Tomaszewskiemu, Grzegorzowi Iszkule, Piotrowi Kosińskiemu

Pani Dr Katarzynie Marcysiak

Pani Małgorzacie Kosińskiej i Izabeli Żabińskiej

Katarzynie Klajbor, Maciejowi Sękiewiczowi, Pani Małgorzacie
Łuczak, Monice Litkowiec i Pani Marii Ratajczak

Katarzynie Kerber

Angelowi Romo, Toldze Ok i Dmytrowi Iakushenko

1.	Wstęp	7
1.1.	Przedmiot badań.....	7
1.1.1.	Pozycja taksonomiczna i zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe <i>Pinus sylvestris</i> ...	7
1.1.2.	Rozmieszczenie geograficzne i warunki występowania	10
1.1.3.	Historia <i>Pinus sylvestris</i>	11
1.1.4.	Zmienność sosny w Europie i południowo-zachodniej Azji.....	14
2.	Cel.....	17
3.	Materiały i metody.....	18
3.1.	Wybór populacji do badań	18
3.2.	Badania cech morfologicznych i anatomicznych igieł.....	24
3.3.	Badania cech morfologicznych szyszek.....	30
3.4.	Analizy DNA sosny zwyczajnej z użyciem markera <i>nad1 H/I mtDNA</i>	32
3.4.1.	Izolacja materiału genetycznego	32
3.4.2.	Reakcja łańcuchowa polimerazy z wykorzystaniem markera <i>nad1 H/I</i>	32
3.4.3.	Elektroforeza.....	33
3.5.	Metody statystyczne.....	34
3.5.1.	Analizy statystyczne stosowane w biometrii	34
3.5.2.	Analizy statystyczne stosowane w genetyce.....	35
3.6.	Algorytm Monmoniera dla danych biometrycznych i molekularnych	37
4.	Wyniki.....	38
4.1.	Analizy biometryczne	38
4.1.1.	Charakterystyka ogólna populacji.....	38
4.1.1.1.	Zmienność cech igieł	50
4.1.1.2.	Zmienność cech szyszek	55
4.2.	Zależności cech.....	58
4.3.	Zależność cech od wysokości nad poziomem morza i położenia geograficznego	60
4.4.	Relacje pomiędzy populacjami <i>Pinus sylvestris</i>	63
4.5.	Analizy genetyczne	75
4.6.	Bariery geograficzne	79
5.	Dyskusja.....	81
5.1.	Analizy biometryczne	81
5.1.1.	Charakterystyka cech igieł.....	81
5.1.2.	Charakterystyka cech szyszek.....	83
5.2.	Zróżnicowanie populacji sosny zwyczajnej w refugiach.....	84
5.3.	Cechy wyróżniające taksony w obrębie <i>Pinus sylvestris</i>	90
6.	Wnioski.....	95
7.	Literatura.....	96

1. Wstęp

1.1. Przedmiot badań

1.1.1. Pozycja taksonomiczna i zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe *Pinus sylvestris*

Pozycja taksonomiczna *Pinus sylvestris* L. była szeroko dyskutowana przez wielu autorów (Shaw 1914; Pilger 1926; Gaussen i in. 1964; Mirov 1967; Giertych i Mátyás 1991; Vidaković 1991; Boratyński 1993; Krupkin i in. 1996; Price i in. 1998; Wang i in. 1999; Geadá López i in. 2002, Gernandt i in. 2005). Sosna ta należy do rodzaju *Pinus*, rodziny *Pinaceae*. Według Koehne (1893) zaliczana jest do sekcji *Diploxylon*, podsekcji *Pinaster*. Little i Critchfield (1969) włączyli sosnę zwyczajną do podrodzaju *Pinus*, sekcji *Pinus*, i podsekcji *Sylvestres* a ostatnio została zaliczona do podsekcji *Pinus* (Kaundun i Lebreton 2010).

Z powodu niezwykle szerokiego zasięgu geograficznego, jakim charakteryzuje się sosna zwyczajna oraz dużego zainteresowania tym gatunkiem a także z uwagi na znaczny postęp w badaniach w obrębie gatunku, wyróżniono wiele taksonów niższej rangi, tj. podgatunki, odmiany, klimatypy, ekotypy, rasy i formy (Wulf 1927; Svoboda 1953; Krüssmann 1972; Ruby i Wright 1976; Molotkov i Patlay 1991; Boratyński 1993). Już prawie 200 lat temu Vilmorin wyróżnił szereg ras sosny zwyczajnej (za Staszkiwiczem 1961) jednak dopiero Svoboda (1953) przedstawił szczegółowy podział gatunku. Na podstawie zajmowanego przez taksony niższej rangi obszaru oraz cech wzrostowych i morfologicznych wyróżnił on trzydzieści pięć klimatypów. Nieco mniej odmian geograficznych (30) rozpoznał Gaussen (1960). Staszkiwicz w latach 1961-1968 w oparciu o cechy szyszek wyróżnił w Europie około dziesięciu morfotypów (Ryc. 1), natomiast Ruby i Wright (1976) (Ryc. 2), w oparciu o cechy fenotypowe, obszar występowania oraz zróżnicowanie biochemiczne opisują dwadzieścia odmian geograficznych.

Szczególną uwagę zwracano na sosnę pochodzącą z południowej Europy i Turcji. Wyróżnia się ona m. in. bardzo ciemnozieloną barwą igieł, dużymi nasionami oraz specyficznym chemizmem igieł (Ruby i Wright 1976), a także kształtem tarczek w szyszkach, formą spękania korowiny i pokrojem drzewa (Svoboda 1953). W sumie na południu Europy i w południowo-zachodniej Azji opisywano około 7-8 taksonów. Ponieważ w pracy będę się posługiwać nazwami taksonów niższej rangi, załączam ich krótkie opisy, które opieram na pracach Svobody (1953) oraz Ruby'ego i Wrighta (1976):

Pinus sylvestris var. *iberica* Svoboda (za: Svoboda 1953; Ruby i Wright 1976), synonim: *P.s.* var. *catalaunica* Gaussen¹ – występuje w rejonach górskich Półwyspu Iberyjskiego (Góry Kantabryjskie i Iberyjskie, Montes Universales, Serrania de Cuenca, Sierra de Guadarrama, Sierra de Gúdar) na wysokości od 1200-2100 m n.p.m. Charakteryzuje się ciemnozielonymi igłami oraz wysoką zawartością α -pinenu i β -felandrenu (Tobolski i Hanover 1971).

¹ Nazewnictwo taksonów niższego rzędu zachowałam za pracami źródłowymi

Pinus sylvestris var. *nevadensis* Christ (za: Svoboda 1953; Ruby i Wright 1976), synonim: *P.s.* var. *hispanica* Svoboda – zajmuje najbardziej południowe obrzeża zasięgu w Górach Sierra Nevada i Sierra de Baza (Gausсен 1960, 1964; Amaral Franco 1986; Prus-Głowacki i Stephan 1994), na wysokości 1600-2000 m n.p.m. Charakteryzuje się krótszymi, grubszymi i szerszymi igłami niż typowa *P. sylvestris* (Boratyńska i Hincа 2003).

Pinus sylvestris var. *pyrenaica* Svoboda (za: Svoboda 1953; Ruby i Wright 1976) – występuje w Pirenejach do 1600 m n.p.m. Jest odmianą o wysokiej zawartości limonenu w igłach; pośrednią pomiędzy *P.s.* var. *iberica* a *P.s.* var. *aquitana*.

Pinus sylvestris var. *aquitana* Schott (za: Svoboda 1953; Ruby i Wright 1976), synonimy: *P.s.* var. *avernensis* Bayer, *P.s.* var. *caussicola* Svoboda – zasięgiem obejmuje Masyw Centralny na wysokościach od 600 do 1200 m n.p.m. Jest bardzo słabo odporna na zmiany klimatyczne i uszkodzenia przez owady. Posiada krótkie, szerokie, sztywne i ostro zakończone igły zawierające dużą ilość β -pinenu oraz ciężkie szyszki.

Pinus sylvestris var. *illyrica* Svoboda (za: Svoboda 1953; Ruby i Wright 1976) – występuje w górach Chorwacji, Czarnogóry, Serbii, Bośni i Hercegowiny oraz Słowenii, na wysokościach 300-1000 m n.p.m. Tworzy płaskie, parasolowate korony oraz wykazuje dużą odporność na uszkodzenia spowodowane przez *Hylobius radialis* Buchanan i *Dioryctria zimmermani* (Grote).

Pinus sylvestris var. *rhodopea* Svoboda (za: Svoboda 1953; Ruby i Wright 1976) – zasięg obejmuje tereny górskie południowej Bułgarii i północnej Grecji, od 700 do 2100 m n.p.m. Igły charakteryzują się średnią długością oraz niską zawartością 3-karenu i terpinolenu.

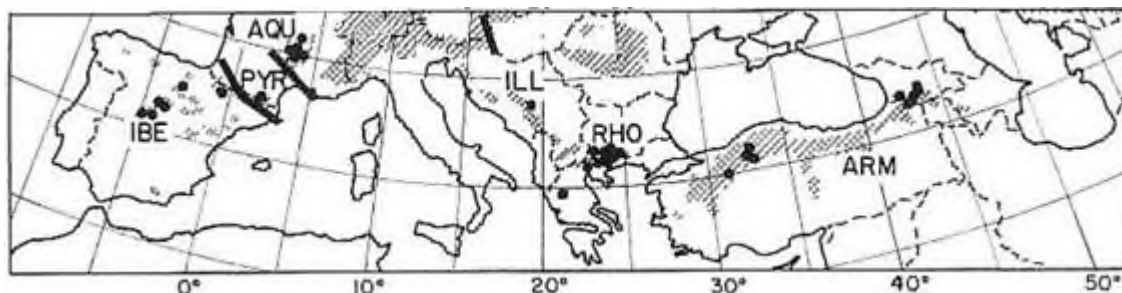
Pinus sylvestris var. *armena* K. Koch (za: Ruby i Wright 1976), synonimy: *P.s.* var. *hamata* (Steven) Komarov, *P.s.* var. *kochiana* Klotzch ex C. Koch, *P.s.* var. *caucasica* Fischer, *P.s.* var. *altissima* Ledeb. ex Gordon, *P.s.* var. *sosnowskyi* Nakai – występuje na Krymie, w Turcji, Armenii i Gruzji. Podobna do *P.s.* var. *rhodopea*, jednak obficie obradza.

Pinus sylvestris var. *pontica* C. Koch (za: Svoboda 1953), synonimy: *P.s.* var. *armena* Koch, *P.s.* var. *pontica* Bayer – zajmuje tereny góryste Anatolii, na wysokościach 700-2100 m n.p.m.. Wygląda podobnie jak sosna typowa pochodząca ze środkowej Europy jednak łuski szyszek przyjmują formę hakowatą.

Pinus sylvestris var. *caucasica* Busch-Fisch. (za: Svoboda 1953), synonimy: *P.s.* var. *hamata* Stev., *P. kochiana* Klotzch, *P. hamata* D. Sosn. – zajmuje izolowany teren na Kaukazie, gdzie rośnie na wysokości od 300 do 2400 (max. 2700) m n.p.m. Ma proste, gładkie pnie, stożkowate lub walcowate korony, igły zielone lub srebrzyste (f. *argentea*). Szyszki przeważnie połyskliwe z hakowatymi apofizami.



Rycina 1. Zasięg klimatypów górskich *Pinus sylvestris* (wg Svobody 1953, zmodyfikowane). 1 *P.s. nevadensis*, 2 *P.s. iberica*, 3 *P.s. pyrenaica*, 4 *P.s. aquitana*, 5 *P.s. illyrica*, 6 *P.s. rhodopea*, 7 *P.s. pontica*, 8 *P.s. caucasica*



Rycina 2. Zasięg odmian geograficznych *Pinus sylvestris* na tle zasięgu gatunku (wg Ruby'ego i Wrighta 1976, zmodyfikowane). *IBERICA*, *PYRENAICA*, *AQUITANA*, *ILLYRICA*, *RHODOPEA*, *ARMENA*

Ze względu na morfologię szyszek Staszkievicz (1961) przytacza następujące odmiany i formy *Pinus sylvestris*:

var. communis Aiton (1879) – syn. *Pinus sylvestris* var. *genuina* Heer (1862) w ramach której wyróżnia się dwie formy:

f. *plana* (Christ 1864) posiadająca piramidy niższe od połowy szerokości tarczki;

f. *gibba* (Christ 1864) o piramidach wyższych od połowy szerokości tarczki;

var. uncinata D. Don (1810) – syn. *Pinus sylvestris* var. *reflexa* Caspary (1882), *Pinus sylvestris* var. *hamata* Wilkomm (1887) et auct. alii non Steven (1838). Tarczki tej odmiany posiadają piramidy wydłużone i hakowato zagięte ku podstawie lub szczytowi szyszki.

W ostatnich latach z terenu Turcji opisano dodatkową odmianę – *Pinus sylvestris* subsp. *hamata* (Steven) Fomin var. *compacta* Tosun. Od typowej sosny zwyczajnej wyróżnia się mniejszymi szyszkami i nasionami, krótszymi igłami oraz cechami anatomicznymi drewna (Yaman 2007 i tam cytowane).

1.1.2. Rozmieszczenie geograficzne i warunki występowania

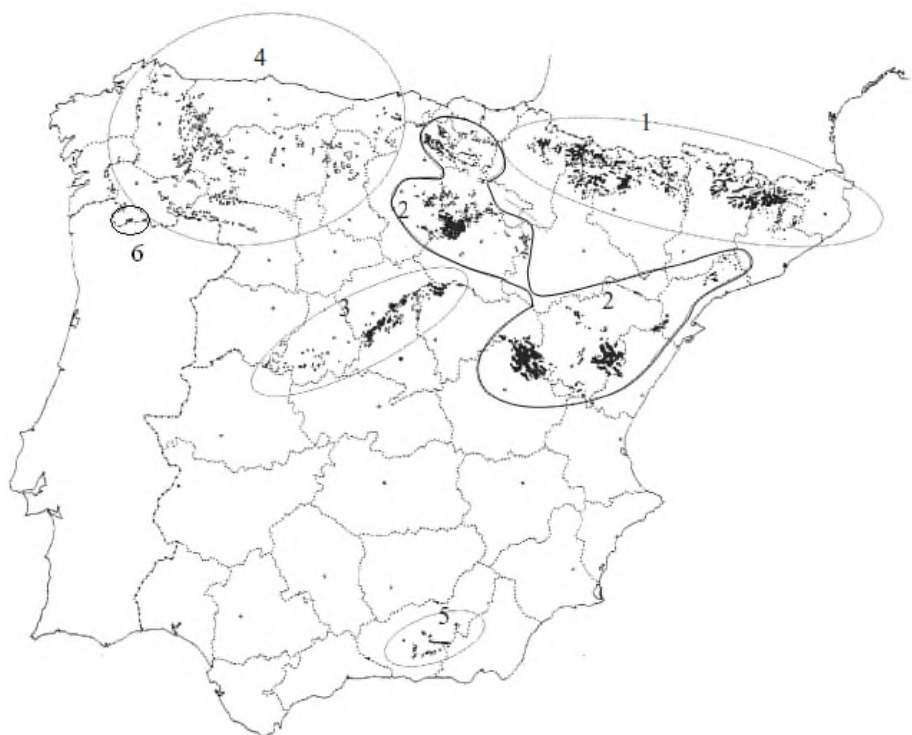
Występowanie *Pinus sylvestris* L. opisane zostało w wielu pracach (np. Svoboda 1953, 1971; Steven i Carlisle 1959; Polakov i Pavlov 1956; Wu 1956; Florin 1963; Coode i Cullen 1965; Meusel i in. 1965; Critchfield i Little 1966; Jasičova 1966; Mirov 1967; Eličin 1970 a i b; Jalas i Souminen 1973; Sokolov i in. 1977; Bobrov 1975; Fenaroli i Gambi 1976; Boratyńska i in. 1981; Grubov 1982; Welten i Sutter 1982; Vigo i Bonada 1983; Aseginolaza Iparragirre i in. 1985; Barbarič i in. 1986; Hultén i Fries 1986; Christensen 1986; Haeupler i Schönfelder 1989; Boratyński 1991, 1993; Boratyński i in. 1992; Carreras Raurell i in. 1993; Browicz 1994; Villar i in. 1997; Martínez García i Montero 2000; Pardo i Gil 2005; Eckenwalder 2009; Farjon 2010). Sosna zwyczajna jest typowym gatunkiem eurosyberyjskim (Ryc. 4) o największym wśród sosen zasięgu geograficznym (Obmiński 1970; Farjon 1984, 1998; Vidakovič 1991; Richardson 1998). Najdalej na zachód wysunięte stanowiska *Pinus sylvestris* znajdują się w Portugalii w Serra de Gerês na około 8° długości geograficznej zachodniej a na wschodzie na około 141° długości geograficznej na dalekim wschodzie Rosji (Boratyński 1991, 1993). Zasięg sosny w kierunku północ – południe rozciąga się od nieco ponad 72° szerokości geograficznej w Norwegii po 37° szerokości geograficznej w Sierra Nevada w Hiszpanii. W Azji najbardziej wysunięte na południe stanowisko położone jest na 38°41' szerokości geograficznej chociaż istnieją doniesienia o stanowiskach położonych jeszcze bardziej na południe (Tolga Ok, przekaz słowny). Populacje marginalne tego gatunku często są silnie izolowane od głównego zasięgu poprzez dużą odległość lub specyficzne warunki siedliskowe. Funkcjonują one jako odrębne „wyspy” (Stern i Roche 1974).

Na Półwyspie Iberyjskim *Pinus sylvestris* występuje w górach (Ryc. 3). W Pirenejach sosna zwyczajna tworzy lasy od południowych stoków w okolicach Pamplony (Navarra) na zachodzie po Rippoll, Gerona (Katalonia) na wschodzie. Występuje tam na wysokościach pomiędzy 1000 a 1800 (2000) m n.p.m. (Montserrat 1976; Gruber 1981; Vigo i Bonada 1983; Aseginolaza Iparragirre i in. 1985; Costa Tenorio i in. 1997; Villar i in. 1993). W Górach Kastylijskich, w skład których wchodzi Sierra de Guadarrama, sosna występuje na wysokościach od 1200 do ponad 2000 m n.p.m. W Górach Iberyjskich najczęściej spotkać ją można między 600 a 1900 m n.p.m. (Martínez García i Montero 2000). Na południu w Górach Betyckich (z łańcuchem Sierra de Baza i Sierra Nevada) sosna zajmuje obszary najwyżej położone, najczęściej między 1600 a 2100 m n.p.m. (Font Quer 1954).

Południowa granica zasięgu gatunku biegnie przez północną Grecję i Anatolię aż po Kaukaz (Browicz 1994). W Turcji sosna zwyczajna występuje od 28°50'E na zachodzie po 43°05'E na wschodzie i od 41°48'N na północy do 38°34'N na południu (Yaman 2007 i prace cytowane). Rośnie na wysokościach od 100 do ponad 2500 m n.p.m. (Czeczott 1939; Coode i Cullen 1965; Eličin 1970 a i b) a jej stanowiska pokrywają powierzchnię około 500 000 hektarów.

Sosna zwyczajna jest gatunkiem o bardzo szerokiej ekologicznej amplitudzie (Vidakovič 1991). Występuje nawet na obszarach, gdzie średnia amplituda termiczna wynosi 60°C a średni opad roczny jest mniejszy niż 300 mm (Przybylski 1993; Boratyński 1993 i prace tam cytowane), przy czym rośnie ona zarówno na stanowiskach,

gdzie roczny opad wynosi niewiele ponad 200 mm, jak i na takich, gdzie wynosi powyżej 1000 mm (Przybylski 1972).

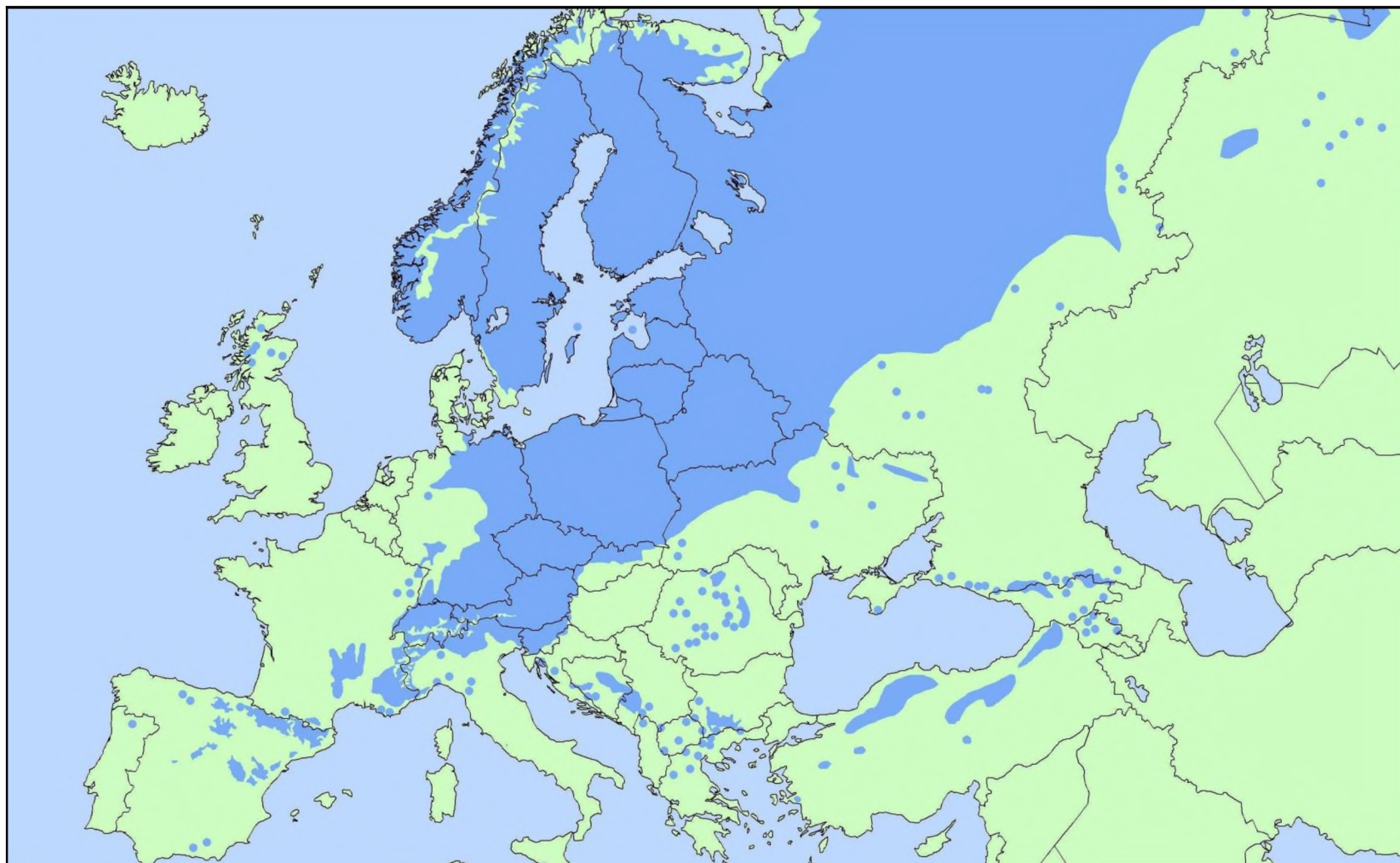


Rycina 3. Występowanie *Pinus sylvestris* na Półwyspie Iberyjskim: 1. Pireneje, 2. Góry Iberyjskie, 3. Góry Kastylijskie, 4. Góry Kantabryjskie, 5. Góry Betyckie, 6. Serra de Gerês (wg Martínez García i Montero 2000, uzupełnione)

1.1.3. Historia *Pinus sylvestris*

Wszystkie współcześnie występujące rodziny drzew iglastych pojawiły się najprawdopodobniej w mezozoiku (Taylor i in. 2009). Fosylia taksonów z rodzaju *Pinus* odnajdywano w pokładach z Jury przed około 160-190 mln. (Pilger 1926). W nawiązaniu do danych paleobotanicznych można stwierdzić, że *Pinus sylvestris* lub jej bliski przodek występował na terenie Europy już w trzeciorzędzie (obecnie Neogen). Zabłocki (1928) opisuje szyszki *Pinus sylvestris miocaenica* z osadów miocenów w kopalni soli w Wieliczce, a już prawie typową *Pinus sylvestris* z pliocenu Portugalii (Staszkiwicz 1968). Przyjmuje się, że sosny wykształciły się we wschodniej Azji, skąd rozprzestrzeniły się i dotarły do Europy (Mirov 1967; Svoboda 1971).

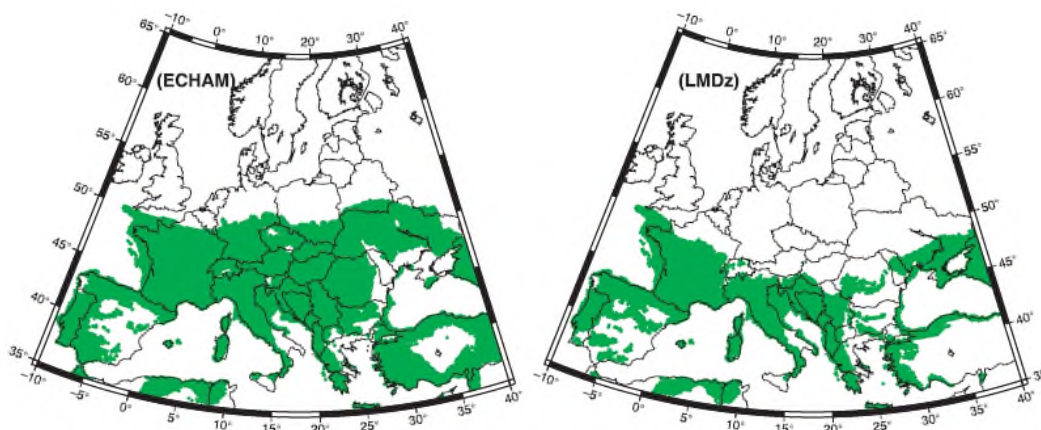
Okresem dynamicznym, jeżeli chodzi o zmiany zasięgu sosny zwyczajnej był plejstocen. Tradycyjnie uważa się, że okresy zlodowaceń gatunki drzew przetrwały na terenach refugialnych położonych na południowych półwyspach naszego kontynentu (Huntley i Birks 1983; Hewitt 1996; Richardson 1998; Sinclair i in. 1999; Willis i van Andel 2004; Robledo-Arnuncio i in. 2005; Cheddadi i in. 2006; Magri i in. 2006; Farjon 2008; Soto i in. 2010). Jednakże historia pionierskich gatunków borealnych, do których zalicza się sosnę zwyczajną (Przybylski 1993; Falińska 2004; Ralska-Jasiewiczowa i in. 2004) może się znacząco różnić od bardziej ciepłolubnych gatunków z rodzaju *Quercus* czy *Tilia* (Petit i in. 2003).



Rycina 4. Współczesny zasięg *Pinus sylvestris* L. EUFORGEN 2009, www.euforgen.org

Dane dotyczące występowania pyłków i makroszczałków oraz symulacje w oparciu o dane klimatyczne świadczą o występowaniu *Pinus sylvestris* na terenie środkowej Europy nawet w okresie ostatniego maksimum czyli około 25000 do 18000 lat temu (Müller i in. 2003; van Andel 2004; Ralska-Jasiewiczowa i in. 2004; Cheddadi i in. 2006) (Ryc. 5). Wysoki poziom pyłków *Pinus* w diagramach pyłkowych z Francji z okresu maksymalnego zlodowacenia jest często tłumaczony dalekodystansowym transportem pyłku z Półwyspu Iberyjskiego (Beaulieu i Reille 1984).

Reliktowy charakter południowoeuropejskich i południowo-zachodnio azjatyckich stanowisk *Pinus sylvestris* nie jest na ogół podważany (Svoboda 1953; Gaussen 1960; Mirov 1967; Molotkov i Patlaj 1991; Naydenov i in. 2007). Obecnie coraz częściej zwraca się uwagę, że mogą to być relikty trzeciorzędowe jak i plejstoceny, a wśród tych ostatnich relikty interglacjalne różnego wieku i pochodzenia (Staszkiwicz 1968; Sinclair i in. 1999; Soranzo i in. 2000; Pyhäjärvi i in. 2007). Dzięki dobrze zachowanym pyłkom na terenie Śródziemnomorza istnieje wiele danych na temat tego regionu (Müller i in. 2003). W Grecji duży wzrost udziału pyłku *Pinus* miał miejsce ok. 16000 lat temu (Bottema 1975) a na Półwyspie Iberyjskim (Pérez-Obiol i Julia 1994) i Apenińskim od około 16500 lat temu (Willis i in. 1998), co zwykle jest interpretowane jako wykształcenie się lasów ze znacznym udziałem lub dominacją *P. sylvestris*, zwłaszcza na obszarach górskich. Willis i van Andel (2004) na podstawie makroszczałków stwierdzają jednoznacznie obecność *Pinus sylvestris* na Węgrzech między 35000 a 15000 lat temu. Oznacza to, że poza utrwalonymi w literaturze poglądami na temat istnienia refugium plejstoceny usytuowanych na południowych krańcach Europy, w trakcie ostatniego glacjału mogło istnieć również refugium w środkowej Europie, na południowym przedpolu Karpat (Cheddadi i in. 2006).



Rycina 5. Potencjalny zasięg *Pinus sylvestris* w oparciu o generalne modele cyrkulacji (CARAIB) w okresie maksymalnego zasięgu lodowca przedstawiony w pracy Cheddadi i in. (2006), ECHAM – symulacja w oparciu o opady, LMDz – symulacja w oparciu o temperaturę

1.1.4. Zmienność sosny w Europie i południowo-zachodniej Azji

Sosna zwyczajna jest w Europie bardzo ważnym gatunkiem lasotwórczym, stąd poznanie jej zmienności było tematem wielu opracowań wykonanych na podstawie cech morfologicznych (np. Staszkiwicz 1961, 1993 i cytowana literatura; Boratyńska i Bobowicz 2001 i cytowana literatura; Marcysiak 2005 i cytowana literatura), markerów izoenzymowych (np. Mejnartowicz 1979, 1993; Prus-Głowacki i Stephan 1994; Prus-Głowacki i in. 2003) oraz markerów genetycznych (Sinclair i in. 1999; Soranzo i in. 2000, Naydenov i in. 2007; Pyhäjärvi i in. 2007a, b i cytowana literatura). O ile zmienność *P. sylvestris* w południowo-zachodniej Europie była analizowana kilkakrotnie (np. Prus-Głowacki i Stephan 1994; Neet-Sarqueda 1994; Provan i in. 1998; Provan i in. 1999; Soranzo i in. 2000; Boratyńska i Hincă 2003; Prus-Głowacki i in. 2003; Robledo-Arnuncio i in. 2005; Cheddadi i in. 2006;), o tyle izolowanym obszarem występowania gatunku na Półwyspie Bałkańskim oraz w górach azjatyckiej części Turcji poświęcono mniej uwagi (Mejnartowicz 1979; Kieliszewska-Rokicka 1981; Turna 2003; Bilgen i Kaya 2005; Pyhäjärvi i in. 2007 a, b). Podobnie, w niewielu tylko pracach porównywano pod względem morfologicznym, anatomicznym oraz genetycznym populacje *P. sylvestris* z Półwyspu Iberyjskiego do populacji z Bałkanów oraz gór Anatolii (Kieliszewska-Rokicka 1981; Naydenov i in. 2005, 2007; Pyhäjärvi i in. 2007a, b).

Szczegółowe badania cech morfologicznych szyszek *P. sylvestris*, uznawanych powszechnie za diagnostyczne w obrębie rodzaju *Pinus* (Shaw 1914; Mirov 1967), a zwłaszcza gatunków pokrewnych *P. sylvestris* (Szweykowski 1969; Krzakowa i in. 1984; Christensen 1987; Christensen i Dar 1996; Musil 1977), prowadzone były przez Staszkiwicza (1961, 1993), jednak nie miał on dostępu do materiału z Półwyspu Iberyjskiego ani z azjatyckiej Turcji. Pomimo to Staszkiwicz (1961, 1968) wykazał dość znaczą odrębność populacji kaukaskich. Współcześnie prace biometryczne przeprowadzono jedynie na szyszkach z populacji *P. sylvestris* z Sierra de Baza na południu Hiszpanii z wykorzystaniem cech igieł (Boratyńska i Hincă 2003) oraz szyszek (Marcysiak 2005). Analizowano także populację *P. sylvestris* z Krymu, wykorzystując cechy igieł (Pashkevich 2005) oraz szyszek (Marcysiak 2006).

Na podstawie współczesnego zasięgu gatunku oraz danych paleobotanicznych należy przypuszczać, że sosna zwyczajna, podobnie jak wiele innych gatunków roślin i zwierząt, wykształciła w tych regionach populacje różniące się pod względem morfologicznym, anatomicznym i genetycznym (Soranzo i in. 2000; Cheddadi i in. 2006). Badania na podstawie pojedynczych populacji z Turcji i Hiszpanii przeprowadzone na jądrowym i mitochondrialnym DNA wykazały istnienie dość znacznych różnic między tymi regionami geograficznymi (Pyhäjärvi i in. 2007 a, b).

Dotychczasowe opracowania dotyczące zróżnicowania geograficznego sosny zwyczajnej w rejonach refugialnych dotyczyły przede wszystkim badań izoenzymowych. Wykazywano w nich odrębność iberyjskich i tureckich sosen w porównaniu do populacji rosnących w centrum i na północy Europy (Mejnartowicz 1979; Kieliszewska-Rokicka 1981; Prus-Głowacki i Stephan 1994; Prus-Głowacki i in. 2003). Wykazano także, że sosna zwyczajna z Sierra de Guadarrama w centralnej Hiszpanii różni się od sosny zwyczajnej z północnych Włosech i od sosny pochodzącej z Polski (Lewandowski i in.

2000). Zróżnicowanie populacji iberyjskich, pochodzących z Masywu Centralnego i Turcji z wykorzystaniem terpenów przedstawił Tobolski, Hanover (1971) oraz Semiz i in. (2007).

Zmienność genetyczną sosny zwyczajnej w Hiszpanii na poziomie markerów mitochondrialnych i chloroplastowych analizowali Sinclair i in. (1999), Soranzo i in. (2000), Naydenov i in. (2005, 2007), Cheddadi i in. (2006) oraz Pyhäjärvi i in. (2007a, b). Populacje hiszpańskie okazały się wyjątkowo specyficzne, przy czym niektóre nawiązują do populacji pochodzących z północy oraz ze środkowej Europy a inne zachowują całkowitą odrębność.

Na podstawie współczesnego zasięgu *Pinus sylvestris* (np. Meusel i in. 1965; Boratyński i in. 1992), historii zlodowaceń (Huntley i Birks 1983; Mojski 1993; van Andel 2002; Ehlers i Gibbard 2004) i zróżnicowania genetycznego Pyhäjärvi i współpracownicy (2007 b) podzielili populacje na cztery grupy, zaliczając hiszpańskie i tureckie do grup najbardziej izolowanych. Różnią się one specyficznym haplotypem *mtDNA*, co może wskazywać na ich odrębną historię (Sinclair i in. 1999; Soranzo i in. 2000; Pyhäjärvi i in. 2007a, b). Do trzeciej grupy włączono populacje z terenów najbardziej wysuniętych na północ (Pyhäjärvi i in. l.c.), które były pokryte lodowcem w czasie ostatniego zlodowacenia (Svendensen i in. 1999). W czwartej grupie znalazły się populacje ze środkowej Europy, z terenów, które znajdowały się już poza zasięgiem lądolodu (Willis i van Andel 2004; Cheddadi i in. 2006). Populacje z trzeciej i czwartej grupy (Pyhäjärvi i in. 2007b) skolonizowały obecnie zajmowane tereny około 10000 lat temu (Huntley i Birks 1983; Ralska-Jasiewiczowa i in. 2004). Podobne prace na wybranych populacjach z północno-zachodniej Hiszpanii prowadzone były przez Robledo-Arnuncio i in. (2005), Cheddadi i in. (2006), Scafli i in. (2009) oraz Soto i in. (2010) z wykorzystaniem markerów chloroplastowych. Wykazali oni niewielkie różnice pomiędzy populacjami, odpowiadające historii migracji *P. sylvestris* w plejstocenie, określonej w badaniach palinologicznych (Peñalba i in. 1997; Field i in. 2000; Gandouin i in. 2002; González-Sampériz i in. 2005; Benito Garzón i in. 2007).

W Turcji, na podstawie badań zmienności izoenzymowej, wykazano niewielkie różnice pomiędzy kilkoma porównywanymi populacjami (Turna 2003; Bilgen i Kaya 2007). Tylko jedna populacja wykazywała większą odrębność od pozostałych, na poziomie podobnym jak na Półwyspie Iberyjskim. Pod względem zawartości terpenów w igłach populacje tureckie także nie wykazywały dużego zróżnicowania, natomiast znacznie odróżniały się od porównanej do nich populacji fińskiej (Semiz i in. 2007). Analiza zróżnicowania markerów *cpDNA* i terpenów w kilkunastu populacjach bułgarskich wykazały istnienie dwóch odrębnych grup – południowych i północnych (Naydenov i in. 2005). Może to świadczyć o izolacji populacji sosny zwyczajnej z południa Półwyspu Bałkańskiego od populacji występujących dalej na północy w okresie zlodowaceń plejstocenijskich, podobnie jak to miało miejsce w masywach górskich Hiszpanii (Prus-Głowacki i in. 2003; Cheddadi i in. 2006) oraz we Włoszech (Labra i in. 2006). W obu przypadkach obszary izolacji to doliny wielkich rzek – Ebro na Półwyspie Iberyjskim i Pad na Półwyspie Apenińskim.

Znane jest geograficzne rozmieszczenie mitotypów *nad1* w Europie (Soranzo i in. 2000; Naydenov i in. 2007; Pyhäjärvi i in. 2007a, b) i obecność mitotypu *b* jedynie

na Półwyspie Iberyjskim i na Bałkanach. Sprawia to, że prawdopodobne są dwie hipotezy:

- obydwa mitotypy występowały w trzeciorzędzie obok siebie na obszarze całego zasięgu gatunku
- populacje północne charakteryzowały się mitotypem *a* i południowe mitotypem *b*, przy czym obie linie mateczne mogły powstać w wyniku niekompletnego sortowania linii, co nie jest zjawiskiem rzadkim w rodzaju *Pinus* (Willyard i in. 2009).

2. Cel

Celem rozprawy jest określenie różnic pomiędzy populacjami *Pinus sylvestris* na terenach wokół Morza Śródziemnego uznanych za ostoje flor trzeciorzędowych (Médail i Diadema 2009) w oparciu o dane biometryczne igieł i szyszek oraz rozmieszczenie haplotypów mitochondrialnego rejonu *nad1* (intron H/I). Uzyskane wyniki pozwolą ustalić:

- zmienność anatomiczną i morfologiczną igieł
- zmienność morfologiczną szyszek
- zmienność genetyczną populacji
- jaki jest poziom zmienności morfologicznej gatunku w odniesieniu do zmienności genetycznej
- czy wyniki analiz biometrycznych będą zbieżne z wynikami analiz genetycznych

3. Materiały i metody

3.1. Wybór populacji do badań

Wszystkie badane populacje leżą na terenach uznawanych za ostoje flor trzeciorzędowych obejmujących Półwysep Iberyjski, Masyw Centralny, Bałkany, Anatolię i Półwysep Krymski (Ryc. 6; Tab. 1). Zachodnią część zasięgu reprezentują populacje z Portugalii, Hiszpanii, Andory i Francji, ze środkowej pochodzą populacje z Grecji, Bułgarii i Serbii, a wschodnią, najmniej do tej pory zbadaną, tereny północnej i północno-wschodniej Turcji oraz południowej Ukrainy.

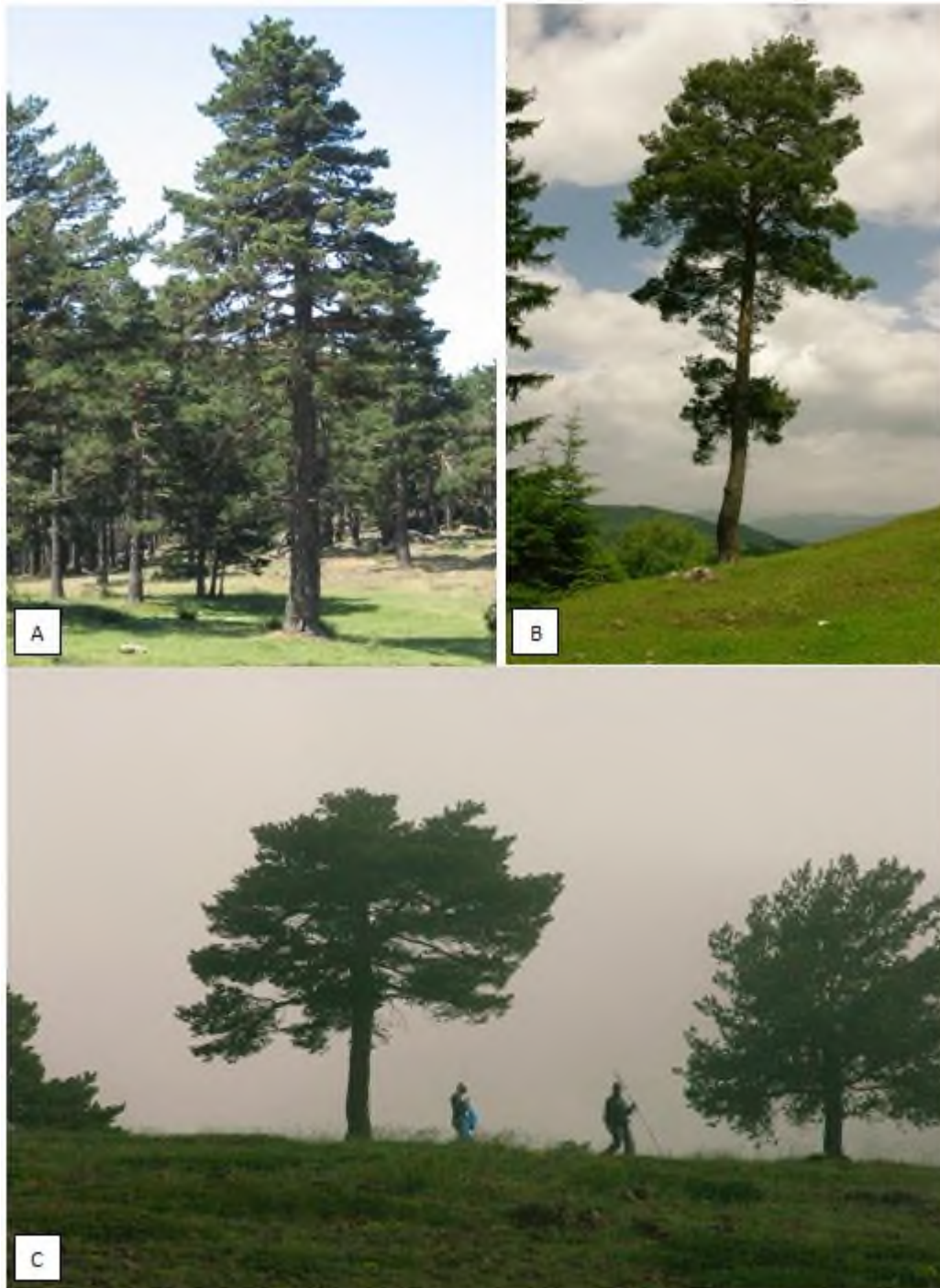
Głównym źródłem informacji na temat występowania populacji sosny zwyczajnej były mapy Meusela i in. (1965). Dokładniejsze dane dotyczące Półwyspu Bałkańskiego i Anatolii zostały opracowane na podstawie pracy Browicza (1994), Boratyńskiego i in. (1990) oraz „Flora of Turkey” (Coode i Cullen 1965). Do badań włączono populacje, w których znajdowały się osobniki w wieku około 100 lat lub więcej (Fot. 1). Większość badanych populacji pochodzi z terenów górskich, gdzie gospodarka leśna nie była i często nadal nie jest prowadzona, co wskazuje na naturalne pochodzenie populacji.

W związku z realizacją wcześniejszych badań nad taksonami z rodzaju *Pinus* część materiału gromadzona była w Pracowni Systematyki i Geografii już od 2001 roku. Materiał uzupełniano w trakcie sześciu wyjazdów terenowych. W zbiorze materiału, poza autorką pracy, brały udział osoby, które od lat związane są z Pracownią Systematyki i Geografii Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku: prof. dr hab. Adam Boratyński, dr hab. Krystyna Boratyńska, dr Angel Romo, Tolga Ok, dr Grzegorz Iszkuło, dr Dominik Tomaszewski, dr Piotr Kosiński, dr Ewelina Muchewicz oraz mgr Karolina Sobierajska.

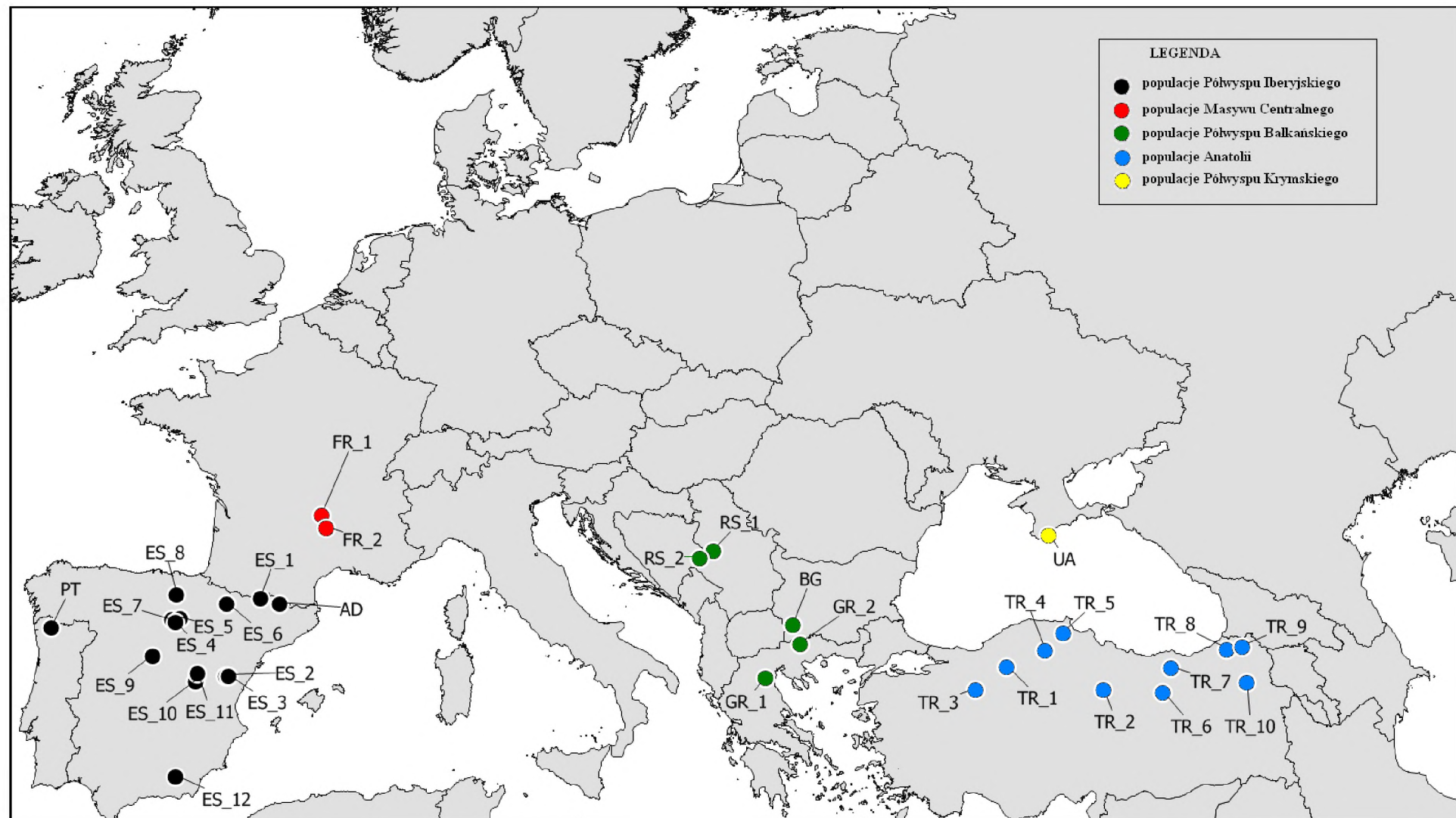
Badania zmienności przeprowadzono w czterech etapach:

- badania cech morfologicznych i anatomicznych igieł (951 osobników reprezentujących 32 populacje)
- badania cech morfologicznych szyszek (1024 szyszek, 21 populacji)
- analiza DNA sosny zwyczajnej użyciem markera *nad1* H/I DNA mitochondrialnego (mtDNA) (956 osobników reprezentujących 32 populacje)
- analizy statystyczne

Wybrane populacje można zaliczyć do taksonów niższego rzędu. Według zasięgów opisanych dla wybranych odmian geograficznych w pracy Ruby'ego i Wrighta (1976) przyporządkowałam populacje następująco: *P.s. nevadensis*- ES_12, *P.s. iberica* – PT, ES_2, ES_3, ES_4, ES_5, ES_7, ES_8, ES_9, ES_10, ES_11, *P.s. pyrenaica* – ES_1, ES_6, AD, *P.s. aquitana* – FR_1, FR_2, *P.s. illyrica* – RS_1, RS_2, *P.s. rhodopea* – BG, GR_1, GR_2, *P.s. armena* – UA, TR_1, TR_2, TR_3, TR_4, TR_5, TR_6, TR_7, TR_8, TR_9, TR_10. Według zasięgów opisanych dla wybranych klimatypów w pracy Svobody (1953) przyporządkowałam populacje następująco: *P.s. nevadensis*- ES_12, *P.s. iberica* – PT, ES_2, ES_3, ES_4, ES_5, ES_7, ES_8, ES_9, ES_10, ES_11, *P.s. pyrenaica* – ES_1, ES_6, AD, *P.s. aquitana* – FR_1, FR_2, *P.s. illyrica* – RS_1, RS_2, *P.s. rhodopea* – BG, GR_1, GR_2, *P.s. pontica* –TR_1, TR_2, TR_3, TR_4, TR_5, TR_6, TR_7, *P.s. caucasica* – UA, TR_8, TR_9, TR_10.



Fotografia 1. Zbiór igieł i szyszek z osobników sosny zwyczajnej: A. Turcja, Tokat-Yıldızeli, 2007; B. Turcja, Kars-Erzurum, 2009; C. Turcja, Artvin, 2009. Fot. A. Boratyński



Rycina 6. Pochodzenie prób *Pinus sylvestris*

Tabela 1. Pochodzenie prób *Pinus sylvestris*, B – próby wykorzystane do badań biometrycznych igieł, G – próby wykorzystane w analizach genetycznych

Akronim	Lokalizacja	Długość geograficzna (°)	Szerokość geograficzna (°)	Wysokość n.p.m. (m)	Liczba osobników		Liczba szyszek	Data zbioru
					B	G		
AD	Andora, St. Miguel d'Engolasters	E 01,57000	N 42,52443	1500	30	32	-	07.2003
BG	Bułgaria, Pirin, Bansko-Razlog	E 23,36446	N 41,88505	1076	30	30	50	06.2009
ES_1	Hiszpania, Pireneje, poniżej Tunel de Viella	E 00,77500	N 42,67133	1550	32	32	-	08.2003
ES_2	Hiszpania, Sierra de Gúdar, Puerto de San Rafael	W 00,72508	N 40,36210	1600	30	30	50	08.2003
ES_3	Hiszpania, Sierra de Gúdar, Valldelinares	W 00,61943	N 40,38333	1950	30	32	-	08.2003
ES_4	Hiszpania, Sierra de Neila	W 03,01135	N 42,05293	1400	31	32	50	07.2003
ES_5	Hiszpania, Sierra de Cebollera, Lago Negro	W 02,63688	N 42,07576	1800	30	30	50	07.2003
ES_6	Hiszpania, San Juan de la Peña, koło Jaki	W 00,66666	N 42,51263	1500	30	30	50	09.2004
ES_7	Hiszpania, Sierra de Urbión, przy Laguna Negra	W 02,83605	N 41,97960	1400	29	30	-	09.2004
ES_8	Hiszpania, Virgala Menor, Vitoria-Gasteiz	W 02,81943	N 42,78685	900	23	23	-	09.2004

Akronim	Lokalizacja	Długość geograficzna (°)	Szerokość geograficzna (°)	Wysokość n.p.m. (m)	Liczba osobników		Liczba szyszek	Data zbioru
					B	G		
ES_9	Hiszpania, Puerto de Navafria niedaleko miejscowości Lozoya	W 03,81525	N 40,98333	1800	29	29	-	05.2006
ES_10	Hiszpania, Cuenca, Uña	W 01,98708	N 40,22018	1300	28	28	-	05.2006
ES_11	Hiszpania, Cuenca, Vega del Codorno	W 01,90316	N 40,44210	1300	30	30	60	05.2006
ES_12	Hiszpania, Sierra de Baza, niedaleko Bazy	W 02,85633	N 37,37575	2000	30	30	50	08.2001
FR_1	Francja, Col de la Croix de Morand	E 03,35000	N 45,15801	1350	30	30	-	09.2004
FR_2	Francja, Col de la Croix de Bor	E 03,53958	N 44,76538	1372	30	30	50	05.2006
GR_1	Grecja, Pieria Ori (Elatothori)	E 22,20380	N 40,31130	1550	30	30	-	09.2007
GR_2	Grecja, Ano Vrandou	E 23,65350	N 41,31246	1350	30	30	50	09.2007
PT	Portugalia, Serra de Gerês	W 08,13100	N 41,80655	800	27	27	-	07.2003
RS_1	Serbia, Divčibare Mts	E 19,99041	N 44,10421	957	30	30	33	09.2009
RS_2	Serbia, wzdłuż drogi z Zaovine do Paljevine	E 19,41943	N 43,87410	960	30	31	32	09.2009
TR_1	Turcja, Gerece-Kızılcahamam	E 32,41566	N 40,64310	1419	30	30	-	06.2007

Akronim	Lokalizacja	Długość geograficzna (°)	Szerokość geograficzna (°)	Wysokość n.p.m. (m)	Liczba osobników		Liczba szyszek	Data zbioru
					B	G		
TR_2	Turcja, Tokat-Yıldızeli	E 36,52930	N 39,96666	1579	32	32	50	06.2007
TR_3	Turcja, Çatacık	E 31,11508	N 39,96210	1619	31	31	50	06.2007
TR_4	Turcja, Tosya Ilgazı Geçidi	E 34,06666	N 41,12960	1583	30	31	50	06.2007
TR_5	Turcja, Bayabat-Sinop	E 34,83826	N 41,64063	1228	30	31	50	06.2007
TR_6	Turcja, Sakaltutan Geçidi, na S od Şiran	E 39,05296	N 39,87051	2010	30	30	50	06.2009
TR_7	Turcja, Gümüşhane, Limni Gölü	E 39,41258	N 40,61013	1980	28	28	52	06.2009
TR_8	Turcja, Artvin	E 41,76666	N 41,15000	1663	30	30	49	06.2009
TR_9	Turcja, Şavşat - Ardahan	E 42,43113	N 41,23325	1700	30	30	50	06.2009
TR_10	Turcja, Kars-Erzurum	E 42,63555	N 40,18980	1850	30	30	50	06.2009
UA	Ukraina, Krym, Jałta, Krasny Kamień	E 34,20221	N 44,55833	1380	31	27	50	07.2006

3.2. Badania cech morfologicznych i anatomicznych igieł

Sposób zbioru materiału oraz metodykę pomiarów igieł przyjąłem za: Staszkiwiczem (1961), Szweykowskim (1969), Boratyńską i Bobowicz (2001) oraz Boratyńską i Boratyńskim (2007). Do metodyki wprowadziłem również nowe cechy i opracowałem metodykę ich pomiaru. Do badań wykorzystałem po około 30 osobników reprezentujących opisane wcześniej populacje *Pinus sylvestris*. Z każdego osobnika pobrałem próbę 10-15 krótkopędów ze słonecznej, południowej części korony z wysokości 2-5 m od podstawy drzewa. Do badań wybrałem igieł dwuletnie, w pełni rozwinięte, bez przebarwień i oznak uszkodzeń przez owady lub grzyby. Bezpośrednio po zbiorze igieł mierzyłem i konserwowałem w 70% alkoholu etylowym (Fot. 2). Do badań wybrałem po 5 igieł z osobnika (każda igieła z innego krótkopędu).

Igieł sosny zwyczajnej mają budowę amfistomatyczną z aparatami szparkowymi w rzędach (Żelawski i Gowin 1967). Na odcinku 2 mm w środkowej części igieł dokonałem odczytów liczby rzędów aparatów szparkowych oraz liczby aparatów szparkowych po wypukłej i płaskiej stronie igieł (cechy 2-5, Tab. 3). Odczyty liczby aparatów szparkowych wykonywałem za każdym razem w trzech miejscach: w dwóch najbardziej skrajnych rzędach oraz jednym środkowym. Do analiz statystycznych wykorzystałem średnią liczbę rzędów i średnią liczbę aparatów szparkowych na odcinku 2 mm dla każdej igieł. Obliczeń dokonywałem na papierze milimetrowym z wykorzystaniem binokularu Nikon SMZ800 (Ryc. 8).

Ze środkowej części igieł (25-75% jej długości), na której obliczałem cechy szparek (cecha 2-5), wykonałem preparaty anatomiczne przekrojów poprzecznych. Jeden osobnik reprezentowany był przez pięć skrawków umieszczonych na wspólnym szkiełku podstawowym. Igieł cięte były ręcznie, a grubość preparatu pozwalająca na odczytanie wybranych cech anatomicznych wynosiła przeciętnie 10-20 μm . Preparaty zatapiałem w mieszaninie alkoholu poliwinylowego (skład w Tab. 2).

Na wykonanych preparatach (w sumie 4725 sztuk) z użyciem mikroskopu świetlnego JenaMed2 (Carl Zeiss, Jena) liczyłem kanały żywiczne po płaskiej i wypukłej stronie igieł, mierzyłem 6 cech związanych z kształtem igieł, kształtem komórek epidermy i hypodermis oraz odległością między wiązkami przewodzącymi (Ryc. 7).

Szerokość, wysokość i kształt komórek epidermy (cechy: 12, 13 i 19) są cechami o wysokiej wartości taksonomicznej (Jählig 1964; Staszkiwicz i Tyszkiewicz 1969; Szweykowski 1969; Bobowicz i in. 1994, 1995, 2001a i b, 2005, 2007; Muchewicz 2007, Pawlaczyk i in. 2010). Na każdym preparacie mierzyłem szerokość trzech sąsiadujących komórek epidermy, do analiz statystycznych wykorzystałem średnią dla przekroju.

Występowanie komórek sklerenchymatycznych przez wielu autorów wykorzystywane jest jako jedna z cech opisujących gatunki z rodzaju *Pinus*, sekcji *Pinus*, podsekcji *Sylvestres* (Keng i Little 1961; Mirov 1967; Szweykowski 1969; Boratyńska i Boratyński 2007; Muchewicz 2007; Sobierajska i Boratyńska 2008). Zgodnie z metodyką przyjętą za Szweykowskim (1969), określałem procentowy udział trzech typów komórek wokół kanałów żywicznych (cecha 21) i czterech typów komórek między wiązkami przewodzącymi (cecha 22) (Tab. 3, Ryc. 9).



Fotografia 2. Pomiar igiel w terenie: A. Turcja, Artvin, 2009 (Fot. A. Boratyński); B. Turcja, Bayabat-Sinop, 2007 (Fot. A. Romo)

Obserwowałam także liczbę warstw komórek sklerenchymatycznych nad floemem; dla cechy tej wyznaczyłam następujące wartości oznaczające:

0 – brak komórek typu włókien nad wiązką przewodzącą

0,1 – pojedyncze, niepołączone ze sobą komórki sklerenchymatyczne nad wiązką przewodzącą

0,5 – pojedyncze komórki sklerenchymatyczne połączone ze sobą w krótkie, kilkukomórkowe pasma poprzedzielane cienkościennymi komórkami

1 – ciągłe, pojedyncze pasmo komórek typu włókien nad wiązką przewodzącą

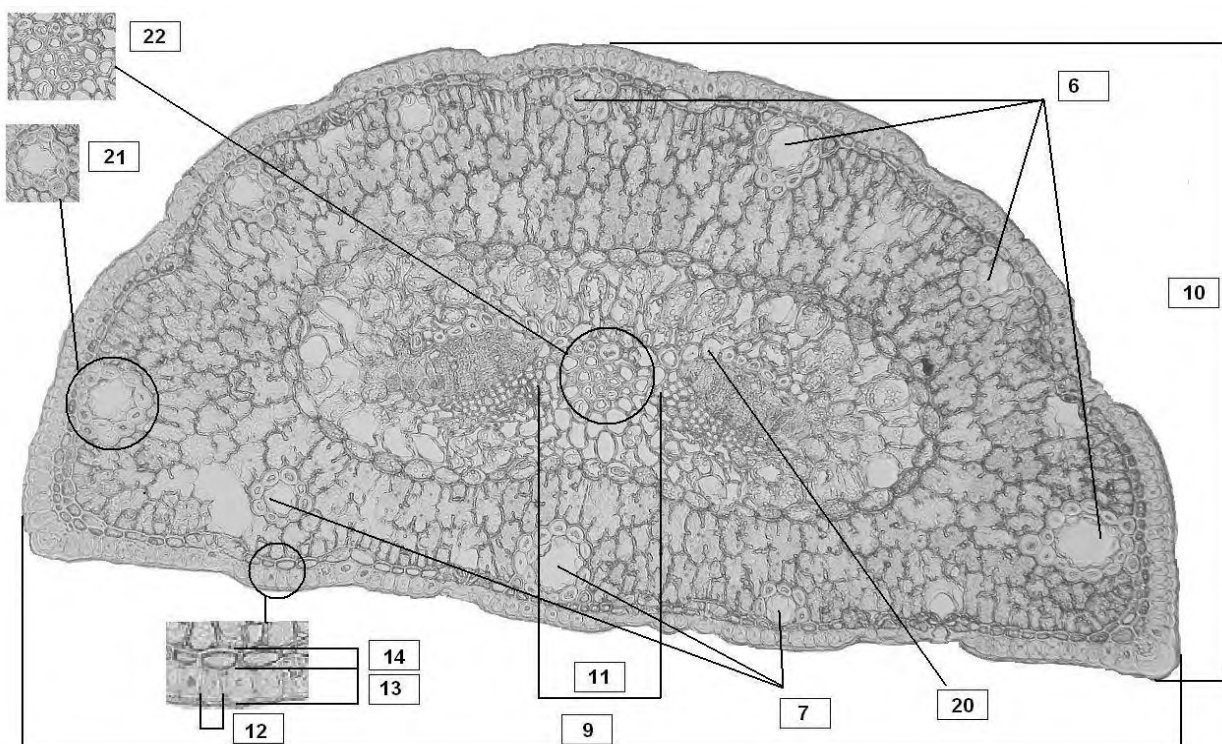
1,5 – ciągłe, pojedyncze pasmo komórek typu włókien nad wiązką przewodzącą z dodatkowymi komórkami sklerenchymatycznymi ponad nimi

2 i więcej – dwa lub więcej ciągłych pasm komórek sklerenchymatycznych nad wiązką przewodzącą.

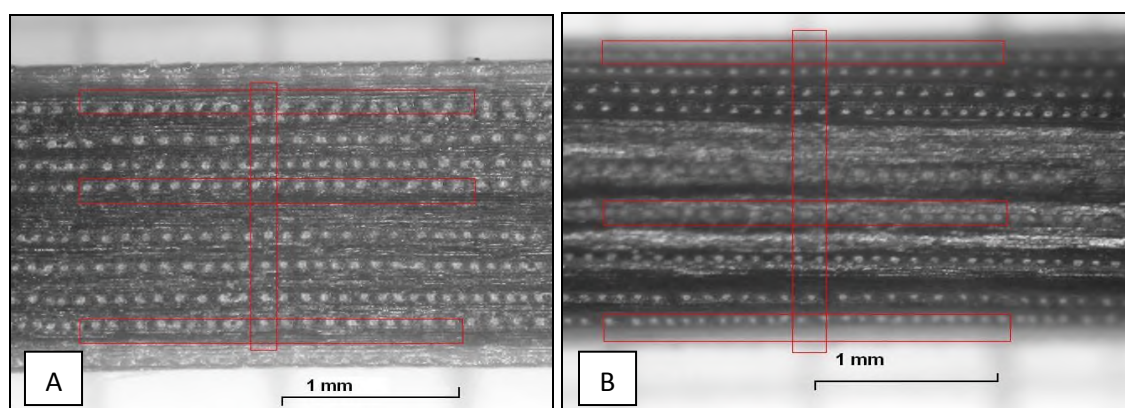
Zespół cech morfologicznych i anatomicznych uzupełniłam pięcioma cechami wynikającymi z przeliczeń cech prostych (cechy 15-19) (Tab. 3).

Tabela 2. Skład mieszaniny do zatapiania preparatów i sposób jej przygotowania

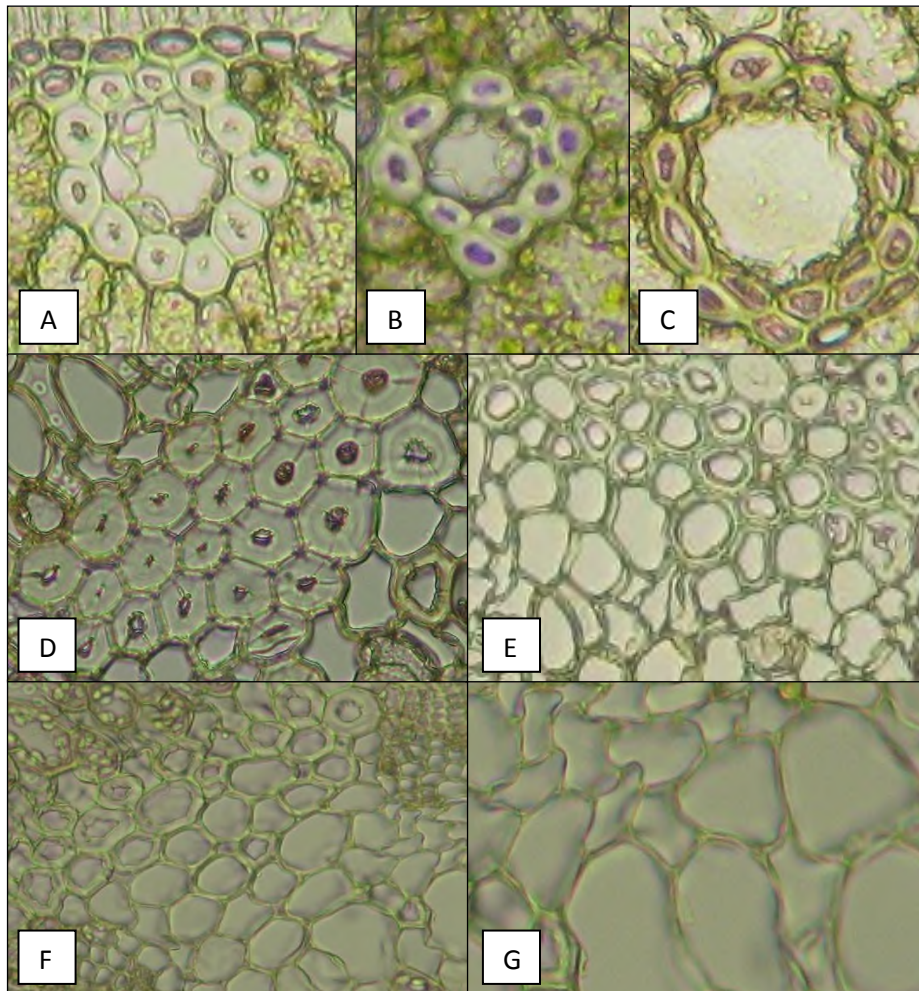
10 g alkoholu poliwinylowego	Dodać wodę do sproszkowanego alkoholu poliwinylowego, powoli, ciągle mieszając. Gotować w przykrytej łaźni wodnej pół godziny, często mieszać. Dodać fenol po wyklarowaniu się mieszaniny.
90 ml wody	
0,5 g fenolu	
8 cm ³ alkoholu poliwinylowego z fenolem	Wymieszać dokładnie składniki. Odstawić na 24 godziny.
2 cm ³ gliceryny	
1 cm ³ formaldehydu 40%	
5 kropli 10% kwasu octowego	



Rycina 7. Sposób pomiaru cech anatomicznych na skrawku poprzecznym igły *Pinus sylvestris*; 6 – liczba kanałów żywicznych po stronie wypukłej igły, 7 – liczba kanałów żywicznych po stronie płaskiej igły, 9 – szerokość igły na przekroju poprzecznym, 10 – wysokość igły na przekroju poprzecznym, 11 – odległość między wiązkami przewodzącymi, 12 – szerokość komórki epidermy, 13 – wysokość komórki epidermy, 14 – wysokość komórki hypodermy, 20 – liczba warstw komórek sklerenchymatycznych nad floemem, 21 – typ komórek sklerenchymatycznych wokół kanałów żywicznych, 22 – typ komórek sklerenchymatycznych między wiązkami przewodzącymi



Rycina 8. Sposób obliczania liczby rzędów aparatów szparkowych (cecha 2 i 3) i liczby aparatów szparkowych (cecha 4 i 5)



Rycina 9. Typy komórek sklerenchymatycznych wokół kanałów żywicznych (A – komórki grubościennne z małym światłem komórkowym, B – typ komórek pośrednich, C – komórki cienkościennne z dużym światłem komórkowym) i między wiązkami przewodzącymi (D – komórki grubościennne z małym światłem komórkowym, E – komórki grubościennne o pośredniej wielkości światła komórkowego, F – komórki cienkościennne z dużym światłem komórkowym, na przekroju owalnym lub okrągłym, G – komórki cienkościennne z dużym światłem komórkowym o nieregularnych kształtach)

Tabela 3. Analizowane cechy igieł

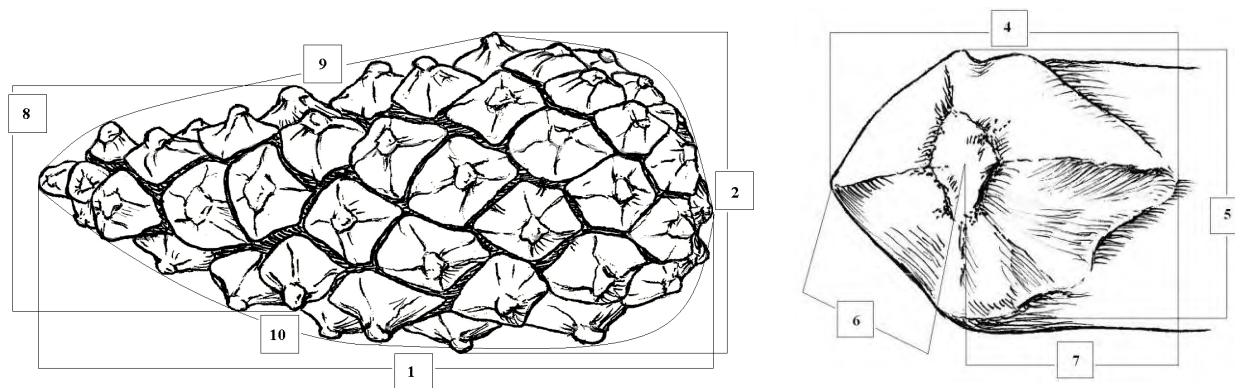
Nr	Cecha	Dokładność
1	Długość igły	0,5 mm
2	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły	1
3	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły	1
4	Średnia liczba aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły	1
5	Średnia liczba aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły	1
6	Liczba kanałów żywicznych po stronie wypukłej igły	1
7	Liczba kanałów żywicznych po stronie płaskiej igły	1
8	Suma kanałów żywicznych	
9	Szerokość igły na przekroju poprzecznym	1 μm
10	Wysokość igły na przekroju poprzecznym	1 μm
11	Odległość między wiązkami przewodzącymi	1 μm
12	Średnia szerokość komórki epidermy	1 μm
13	Średnia wysokość komórki epidermy	1 μm
14	Średnia wysokość komórki hypodermy	1 μm
15	Wskaźnik Marceta (11*9/10)	
16	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły/Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły (2/3)	
17	Średnia liczba szparek po wypukłej/średnia liczba szparek po płaskiej (4/5)	
18	Wysokość igły/Szerokość igły (10/9)	
19	Średnia szerokość komórki epidermy/Średnia wysokość komórki epidermy (12/13)	
20	Liczba warstw komórek sklerenchymatycznych nad floemem	
21	Typ komórek wokół kanałów żywicznych:	
a	Komórki grubościennie z małym światłem komórkowym	
b	Typ komórek pośrednich	
c	Komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym	
22	Typ komórek między wiązkami przewodzącymi:	
a	Komórki grubościennie z małym światłem komórkowym	
b	Komórki grubościennie o pośredniej wielkości światła komórkowego	
c	Komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym, na przekroju owalne lub okrągłe	
d	Komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym o nieregularnych kształtach	

3.3. Badania cech morfologicznych szyszek

Cechy szyszek od zawsze były używane do odróżniania gatunków z rodzaju *Pinus* a ich wartość w pracach taksonomicznych jest trudna do przecenienia (Shaw 1914; Sokołowski 1931; Staszkiwicz 1961, 1963, 1968; Mirov 1967; Farjon 1984; Vidaković 1991). Uważa się, że zmienność organów generatywnych jest mniejsza od zmienności organów wegetatywnych, ponieważ podlegają między innymi mniejszemu wpływowi czynników środowiskowych (Barulina 1930; Rozanova 1946; Stebbins 1958, Staszkiwicz 1961; Bałut 1969, Mejnartowicz 1972).

Biometryczne analizy szyszek *Pinus sylvestris* oparłam na pomiarach 21 prób populacyjnych (Tab. 1). Szyszki zbierane były z drzew stojących. Z każdego zebrano losowo 2-3 szyszki z wysokości 2-5 metrów, po słonecznej, południowej części korony. W przypadku trudności w zbiorze z drzewa próby zbierano z ziemi. W efekcie każda populacja została scharakteryzowana na podstawie pomiaru 50 szyszek zgodnie z metodyką przyjętą przez Staszkiwicza (1961). Wyjątek stanowią populacje z Serbii (RS_1 i RS_2) reprezentowane przez próbę około 30 szyszek (Tab. 1). Zespół cech szyszek ustaliłam w oparciu o wcześniejsze badania różnych taksonów rodzaju *Pinus*, w tym *P. sylvestris* oraz sosen z kompleksu *P. mugo* (Staszkiwicz 1961, 1963, 1968; 1993; Staszkiwicz i Tyszkiewicz 1969, 1976; Szweykowski i Bobowicz 1977, Bobowicz, Korczyk 1990; Bobowicz 1988; Marcysiak i Boratyński 2007). Badaniom poddałam 10 cech mierzonych i 8 przeliczeniowych (Tab. 4). Sposób wykonywania pomiarów przedstawia rycina 10.

Szyszki przed pomiarami moczyłam przez 24 godziny. Następnie przy pomocy suwmiarki elektronicznej (Topex, z dokładnością 0,1 mm lub 1 mm w zależności od cechy) mierzyłam następujące cechy: długość (cecha 1), maksymalna średnica szyszki (cecha 2) oraz średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki (cecha 8) i części obwodu szyszki (cecha 9 i 10). Po przesuszeniu i całkowitym otwarciu się szyszek liczyłam łuski (cecha 3), uwzględniając wszystkie wykształcone, łącznie z najdrobniejszymi. Następnie wycinałam z szyszki po jednej najlepiej wykształconej łusce leżącej w obrębie maksymalnej średnicy szyszki od strony wypukłej i te łuski mierzyłam pod względem długości (cecha 4), szerokości (cecha 5), grubości (cecha 6) i odległości umbo od szczytu tarczki (cecha 7).



Rycina 10. Sposób pomiaru cech morfologicznych szyszek *Pinus sylvestris*; 1 - długość szyszki, 2 - maksymalna średnica szyszki, 4 - długość tarczki, 5 - szerokość tarczki, 6 - grubość tarczki, 7 - odległość umbo od szczytu tarczki, 8 - średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki, 9 - część obwodu szyszki od wierzchołka do nasady - w przypadku szyszek niesymetrycznych - część dłuższa, 10 - część obwodu szyszki od wierzchołka do nasady - w przypadku szyszek niesymetrycznych - część krótsza; rys. K. Kerber

Tabela 4. Analizowane cechy szyszek

Nr	Cecha	Dokładność
1	Długość szyszki	1 mm
2	Maksymalna średnica szyszki	1 mm
3	Liczba łusek	1 sztuka
4	Długość tarczki	0,1 mm
5	Szerokość tarczki	0,1 mm
6	Grubość tarczki	0,1 mm
7	Odległość umbo od szczytu tarczki	0,1 mm
8	Średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki	1 mm
9	Część obwodu szyszki od wierzchołka do nasady - w przypadku szyszek niesymetrycznych - część dłuższa	1 mm
10	Część obwodu szyszki od wierzchołka do nasady - w przypadku szyszek niesymetrycznych - część krótsza	1 mm
11	Długość szyszki/Maksymalna średnica szyszki (cecha 1/2)	
12	Długość szyszki/Liczba łusek (cecha 1/3)	
13	Długość tarczki/Szerokość tarczki (cecha 4/5)	
14	Długość tarczki/Grubość tarczki (cecha 4/6)	
15	Asymetria szyszki (cecha 9/10)	
16	Szerokość szyszki/Liczba łusek (cecha 2/3)	
17	Odległość umbo od szczytu tarczki/Grubość tarczki (cecha 7/6)	
18	Maksymalna średnica szyszki/Średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki (cecha 2/8)	

3.4. Analizy DNA sosny zwyczajnej z użyciem markera nad1 H/I mtDNA

3.4.1. Izolacja materiału genetycznego

Do badań wykorzystywałam zaszuszone roczne igły. Populacje i osobniki otrzymały nazwy i numery zgodne z numeracją osobników wykorzystanych w badaniach biometrycznych igieł i szyszek. W badaniach skorzystałam z procedury izolacji całkowitego DNA opartej na metodzie ATMAB (Dumolin i in. 1995). Do izolacji pobierałam około 0,5 g materiału roślinnego. Materiał był cięty i umieszczany w 2 ml probówkach typu Eppendorf. Igły mieliłam mniej więcej przez 2-3 minuty przy częstotliwości 30 drgań na sekundę, wykorzystując do tego kulki stalowe (po 2-3 kulki na próbę) oraz młyn MM 400 z dwoma adapterami na próbówki Eppendorf 2 ml (Retsch). Do zmielonego materiału dodawałam 1 ml buforu homogenizacyjnego (2% ATMAB, 15 mM PVP 4000, 20 mM EDTA, 0,1 M Tris HCl, 1,4 M NaCl) oraz 70 µl 1 M roztworu DTT (1 M DTT, 0,01 M octan sodu, pH=5,2) a następnie mieszałam do otrzymania jednolitej emulsji. Próby inkubowałam przez 1,5 h w temperaturze 65°C i jednocześnie mieszałam w termomikserze (Eppendorf). Po zakończeniu inkubacji próby studziłam, dodawałam 400 µl dichlorometanu i dokładnie mieszałam. Tak przygotowane próby były wirowane przez 15 minut w 4°C przy 14 000 obrotów/min. Otrzymaną w wyniku wirowania fazę wodną (800 µl) zbierałam do nowych próbówek 2 ml, a po dodaniu 1 ml chloroformu delikatnie mieszałam. Próby ponownie wirowałam przez 15 minut w 4°C przy 14 000 obrotów/min. Kolejnym etapem izolacji było zebranie supernatantu do nowej próbówki 1,5 ml (ok. 400 µl) oraz dodanie 300 µl izopropanolu zmrożonego do temperatury -20°C. Próby na 0,5-1 h umieszczałam w temperaturze -20°C w celu dalszego wytrącania DNA. Po tym czasie próby były wirowane przez 10 minut w 4°C przy 14 000 obrotów/min., supernatant był usuwany, a osad przepłukiwałam 1 ml 70% alkoholu etylowego i wirowałam przez 5 minut w 4°C przy 14 000 obrotów/min. W końcowej fazie wylewałam alkohol i suszyłam pelet w 37°C przez noc. Wyizolowany DNA zawieszałam w 50 µl wody. Stężenie oraz czystość wyizolowanego materiału mierzyłam na fotometrze (BioPhotometr Plus, Eppendorf). Następnie przygotowałam rozcieńczenia ok. 20 ng DNA/µl.

3.4.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy z wykorzystaniem markera nad1 H/I

Polimorfizm typu indel (insercja/delecja) w mitochondrialnym rejonie *nad1* (intron H/I) został opisany przez Soranzo i in. (2000). Początkowo analizowany fragment (intron B/C) miał 2530 pz. W celu uzyskania polimorfizmu fragment został pocięty enzymami restrykcyjnymi (*MseI*, *HaeIII*, *HinfI*, *RsaI*). W wyniku tych działań autorzy pracy uzyskali dwa mitotypy różniące się insercją 31 pz w miejscu 929-960 (EMBL, nr AJ223312). Para primerów została zaprojektowana tak, by zawierała opisaną mutację. Analiza zmienności w tym rejonie opiera się wyłącznie na reakcji PCR i rozdziale amplifikowanych fragmentów na żelu agarozowym.

Warunki reakcji PCR

Do amplifikacji rejonu *nad1* H/I wykorzystałam startery o następującej sekwencji:

F: *nad1* H TTAATCAAAAGGTCCGGAG

R: *nad1* I TGAAGTGACTCGACTACTG

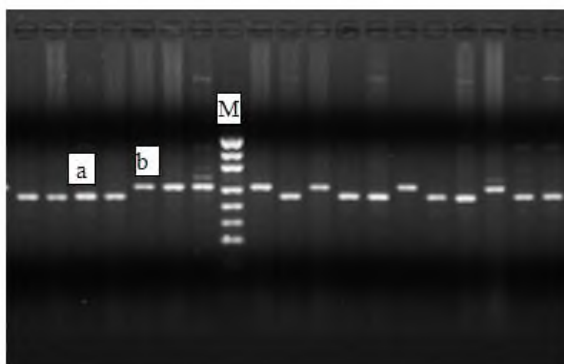
Amplifikację przeprowadziłam w całkowitej objętości 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: ok. 65 ng matrycy DNA, 1× stężony bufor reakcyjny zawierający 25 mM MgCl₂, 0,5 mM każdego z dNTP, 2 µM każdego ze starterów, 7,5 µg BSA, wodę oraz 0,5 U Allegro*Taq* Polimerazy DNA (Novazym). Reakcja prowadzona była zgodnie z następującym profilem temperaturowym:

- wstępna denaturacja – 4 min. w 94°C
- denaturacja – 0,5 min. w 92°C
- przyłączanie starterów – 0,5 min. w 55°C
- wydłużanie – 1 min. w 72°C
- końcowe wydłużanie – 10 min. w 72°C

Sekwencja punktów od 2 do 4 powtórzona była 30 razy. Amplifikacja prowadzona była na termocyklerze C1000 (Bio-Rad).

3.4.3. Elektroforeza

Po amplifikacji produkty PCR rozdzielałam na 2% żelu agarozowym. Aby przygotować żel, rozpuszczałam odpowiednią ilość agarozy w 1× stężonym buforze TBE (bufor TBE 10× stężony: 0,5 M Tris HCl, 10 mM EDTA, 0,5 M H₃BO₃, pH=8,3). Do płynnego żelu dodawałam bromek etydyny (bromek 2,7-diamino-N-etylo-6-fenylofenantrydyny) (EtBr) w ilości 7 µl na każde 100 ml żelu agarozowego. W celu oszacowania względnej wielkości molekularnej, rozdzielone produkty porównywałam ze wzorcem mas cząsteczkowych. Jako markera wielkości użyłam markera wielkości pUC19 DNA/MsoI (Fermentas). Elektroforeza prowadzona była przy napięciu 100V w temperaturze 4°C przez 1,5-2,5 h. Wyniki wizualizowałam pod lampą UV i archiwizowałam z wykorzystaniem systemu do archiwizacji danych BioCapt (Gilbert – Lourmat). Fragmenty o długości 217 pz określiłam za Soranzo i in. (2000) jako mitotyp „a”, natomiast fragmenty o długości 248 pz jako mitotyp „b” (Ryc. 11).



Rycina 11. Przykładowy żel, a - fragment o długości 217 pz, b - fragment o długości 248 pz, M - marker wielkości

3.5. Metody statystyczne

3.5.1. Analizy statystyczne stosowane w biometrii

Analizy zostały przeprowadzone w odniesieniu do każdego osobnika, populacji, refugium oraz łącznie dla całego taksonu. Do analiz posłużyłam się programem Statistica 9 (StatSoft Polska) oraz JMP (SAS Institute Inc.). Przeprowadziłam następujące analizy:

Statystyki opisowe

Dla populacji, jak i wszystkich osobników obliczyłam podstawowe charakterystyki cech: średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, współczynnik zmienności a także odszukałam minimalną i maksymalną wartość poszczególnych cech (Krzysztofiak i Urbanek 1975, Oktaba 1986, Wołek 1992, Zar 1999, Łomnicki 2000).

Współczynnik zmienności Pearsona wyrażony w procentach uzyskałam przez podzielenie odchylenia standardowego (s) próby przez średnią (\bar{x}) tej próby oraz pomnożenie tego ilorazu przez 100%. Bogucki (1979) rozróżnia pięć klas zmienności w zależności od wysokości współczynnika zmienności (Tab. 5)

Tabela 5. Klasy zmienności wg Boguckiego (1979)

współczynnik zmienności	do 5%	6-10%	11-20%	21-50%	ponad 50%
zmienność	mała	umiarkowana	znaczna	duża	bardzo duża

Analiza normalności rozkładu zmiennych

Dla sprawdzenia rozkładu normalności cech wykorzystałam test Shapiro-Wilka. Pozwala on na usunięcie z analiz danych o rozkładzie odbiegającym od normalnego (Moczko i in. 1998, Łomnicki 2000).

Test rozsądnej istotnej różnicy (RIR) Tukeya

Aby określić wpływ poszczególnych cech na zróżnicowanie populacji zastosowałam test rozsądnej istotnej różnicy (RIR) Tukeya (Zar 1999, Łomnicki 2000).

Współczynnik korelacji Pearsona

Został opracowany, aby określić zależności statystyczne dla zmiennych. Szacuje na podstawie testu χ^2 , jak duże są siła i kierunek związku (korelacja) pomiędzy wszystkimi parami zmiennych.

Analiza dyskryminacji

Została użyta, by rozdzielić ewentualne, naturalnie wyłaniające się grupy prób. Uwzględnia ona wpływ grupy zmiennych na inną zmienną w tym samym czasie i pozwala wykazać (lub nie) istotne różnice ich wartości we wszystkich grupach. Rozstrzyga, która zmienna lub zmienne sprawiają, że grupy się rozdzielają w największym stopniu (Watała 2002).

Analiza skupień

Analiza aglomeracji (skupień) ma na celu łączenie prób w związki z zastosowaniem najkrótszej odległości euklidesowej, gdzie liczbę wymiarów determinuje liczba analizowanych cech (Sokal i Rohlf 2003). Dla wizualizacji wyników

grupowania dokonano w analizie skupień sporządziłam dendrogramy, czyli poziome hierarchiczne wykresy drzewkowe.

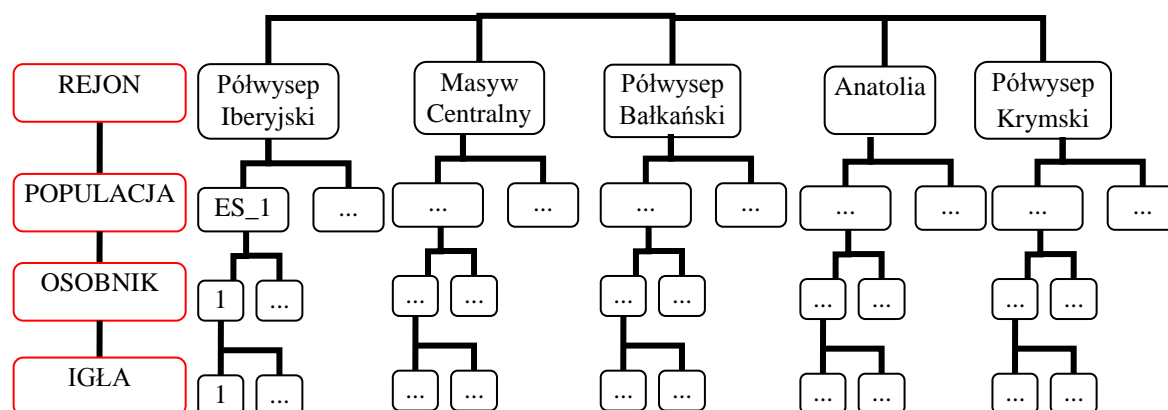
Kwadratowe odległości Mahalanobisa

Miarą oddalenia od siebie poszczególnych grup w przestrzeni wielowymiarowej są odległości Mahalanobisa. Oddają one w najbardziej wiarygodny sposób oddalenie od siebie prób w przypadku, gdy zmienne nie są całkowicie niezależne, co oznacza, że zawierają w sobie także informacje o skorelowaniu zmiennych. Łączenie prób w grupy ściśle wynika z rzędu wielkości odległości Mahalanobisa (Watała 2002).

Hierarchiczna analiza wariancji

Wariancja to w statystyce klasyczna miara zmienności intuicyjnie utożsamiana ze zróżnicowaniem zbiorowości. Jest średnią arytmetyczną kwadratów odchyłeń (różnic) poszczególnych wartości cechy od wartości oczekiwanej. W przypadku hierarchicznej analizy wariancji (zwanej też wariancją zagnieżdżoną) badamy obserwacje lub pomiary zależne od jednego lub wielu działających równocześnie czynników. Metoda ta wyjaśnia, z jakim prawdopodobieństwem wyodrębnione czynniki mogą być powodem różnic między obserwowanymi średnimi grupowymi. Wykonując tę analizę, wykorzystałam poniższy model (Tab. 6).

Tabela 6. Model zastosowany do wykonania hierarchicznej analizy wariancji



3.5.2. Analizy statystyczne stosowane w genetyce

Analizy zostały przeprowadzone w odniesieniu do populacji, refugium oraz łącznie dla całego taksonu. Do analiz posłużyłam się programem GenAlEx 6.2 (Peakall i Smouse 2006).

Wskaźnik dystansu genetycznego wg Neia

Wskaźnik ten wyliczyłam w celu określenia odległości genetycznej. Informuje on o stopniu podobieństwa filogenetycznego między analizowanymi populacjami, będąc funkcją różnic we frekwencji alleli w poszczególnych populacjach.

Analiza molekularnej wariancji AMOVA

Pozwala na hierarchiczne ujęcie zmienności genetycznej i rozdzielenie jej między osobnikami, populacjami i rejonami. W trakcie analizy obliczane są również Φ -statystyki.

- Φ_{PR} w analizie AMOVA z podziałem danych na rejony

$$\phi_{PR} = \frac{V_{AP}}{(V_{AP} + V_{WP})}$$

V_{AP} jest wariancją wśród populacji w regionach, a V_{WP} wariancją w populacjach. Φ_{PR} jest obliczana jako stosunek wariancji między osobnikami w regionach, w stosunku do wariancji między populacjami i wewnątrz populacji. Wartość Φ_{PR} reprezentuje korelację pomiędzy osobnikami w populacji w stosunku do osobników z tego samego regionu. Zazwyczaj jest ona większa od zera.

- Φ_{PT} w analizie AMOVA bez podziału danych na rejony

$$\phi_{PT} = \frac{V_{AP}}{(V_{AP} + V_{WP})}$$

V_{AP} jest wariancją pomiędzy populacjami, a V_{WP} wariancją w populacjach. Φ_{PT} jest obliczany jako proporcja wariancji pomiędzy populacjami w stosunku do całkowitej wariancji. Wartość Φ_{PT} reprezentuje korelację pomiędzy osobnikami w populacji w stosunku do całkowitej wariancji. Jest wartością analogiczną do F_{ST} .

- Φ_{PT} w analizie AMOVA z podziałem danych na rejony

$$\phi_{PT} = \frac{V_{AP} + V_{AR}}{(V_{WP} + V_{AP} + V_{AR})}$$

V_{AR} jest wariancją między regionami, V_{AP} wariancją pomiędzy populacjami, a V_{WP} wariancją w populacjach. Wartość Φ_{PT} jest obliczana jako proporcja sumy wariancji pomiędzy regionami i populacjami w stosunku do całkowitej wariancji.

- Φ_{RT} w analizie AMOVA z podziałem danych na rejony

$$\phi_{RT} = \frac{V_{AR}}{(V_{WP} + V_{AP} + V_{AR})}$$

V_{AR} jest wariancją między regionami, V_{AP} wariancją pomiędzy populacjami, a V_{WP} wariancją w populacjach. Φ_{RT} jest obliczany jako proporcja sumy wariancji pomiędzy regionami i populacjami w stosunku do całkowitej wariancji. Reprezentuje korelację w regionie w stosunku do całkowitej.

Test Mantela

Opiera się on na macierzach odległości i testach permutacyjnych. Metoda jest nieparametryczna i opiera się na niewielu założeniach. Może być wykorzystywana nie tylko w przypadku autokorelacji przestrzennej ale i innych rodzajów autokorelacji, takich jak np. genetyczna. Dla zanalizowania zaburzeń wzorców w czasie i przestrzeni Mantel zbudował randomizacyjny test, który ustala przestrzenną i/lub czasową autokorelację danych przez oszacowanie zależności między dwoma macierzami odległości (podobieństwa). W teście Mantela oblicza się korelację między dwoma macierzami odległości (będących szczególnym przypadkiem macierzy podobieństwa), gdzie jedna

macierz reprezentuje na przykład przestrzenne odległości, a druga reprezentuje różnice między parami. Obliczanie statystyki Mantela prowadzi się według wzoru

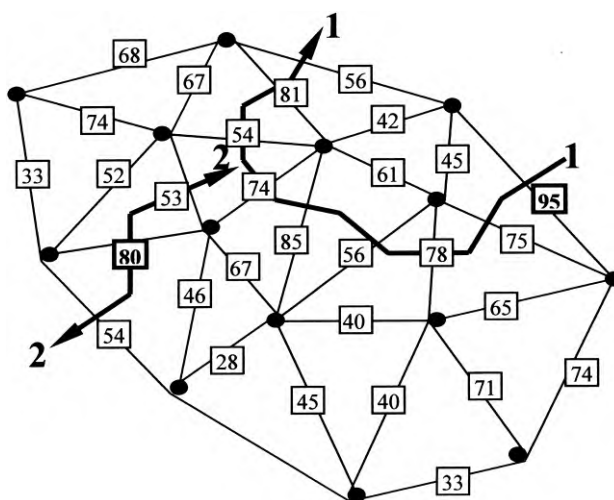
$$Z = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n A_{ij} B_{ij}$$

gdzie $i \neq j$ oraz

gdzie macierz odległości zmiennych (A) może zawierać kilka pomiarów reprezentujących różne reakcje roślin na warunki eksperymentu pomiędzy wszystkimi n jednostkami eksperymentalnymi, a macierz odległości przestrzennych (B) może zawierać aktualne Euklidesowe (przestrzenne) odległości między jednostkami eksperymentalnymi. Macierz musi być kwadratowa (symetryczna) (Mantel 1967; Peakall i Smouse 2006).

3.6. Algorytm Monmoniera dla danych biometrycznych i molekularnych

Związki pomiędzy genetycznymi i geograficznymi odległościami mogą być badane przez autokorelacje lub metody regresji. Niemniej jednak analizy korelacji nie określają, gdzie istnieją genetyczne bariery, czyli obszary, w których występuje nagła zmiana tempa zmian. W tym celu podejście geometrii obliczeniowej jest bardziej odpowiednie, ponieważ zawiera lokalizacje i kierunki barier oraz dlatego że może pokazać, gdzie geograficzne modele z dwóch lub więcej zmiennych są podobne. Pozwala na to algorytm Monmoniera. Metoda ta jest bardzo wiarygodna i może być stosowana do niegenetycznych danych, gdy dane geograficzne zbieranych prób są dostępne. Jako pierwsze na podstawie triangulacji wyznaczane są geograficzne odległości pomiędzy próbkami i zależności pomiędzy nimi. Następnie na podstawie kwadratowych odległości Mahalanobisa lub dystansu genetycznego Neia wyznaczane są największe dystanse pomiędzy populacjami i na ich podstawie wyliczana jest pierwsza granica. Dalej hierarchicznie wyznaczane są kolejne bariery – od najbardziej do najmniej znaczących (Ryc. 12). Bariery wyznaczyłam za pomocą programu Barrier 2.2 (Etienne Guerard, Franz Manni, MNHN 2002).



Rycina 12. Przykładowy sposób wyznaczenia barier geograficznych (wg Manniego i in.2004)

4. Wyniki

4.1. Analizy biometryczne

4.1.1. Charakterystyka ogólna populacji

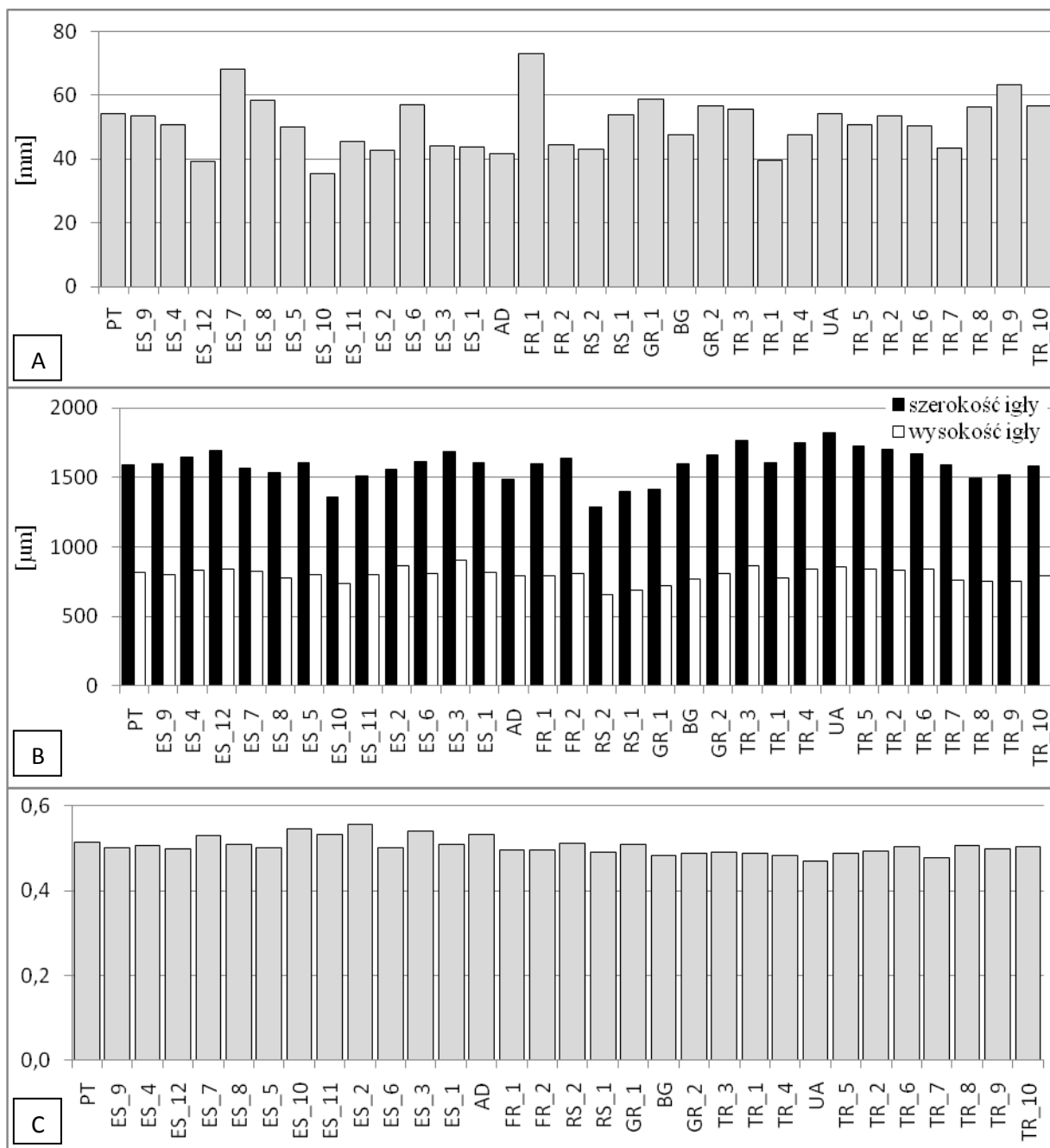
Spośród badanych 32 populacji *Pinus sylvestris* reprezentowanych przez 951 osobników najdłuższymi igłami (cecha 1), średnio 73,0 mm, charakteryzuje się populacja z Francji (FR_1). Najkrótsze igły mają osobniki z populacji hiszpańskiej (ES_10) - średnio 35,3 mm (Ryc. 13A). Populacje z Półwyspu Bałkańskiego cechują się najdrobniejszymi igłami (cecha 9 i 10). W populacji serbskiej (RS_1) przeciętna szerokość poprzecznego przekroju igły wynosi 1284,1 μm , a przeciętna wysokość 654,4 μm . Najszersze pod tym względem są igły osobników z populacji z Półwyspu Krymskiego (UA), średnio mają one 1823,6 μm , a najwyższe (cecha 10) z populacji z Sierra de Gúdar w Hiszpanii (ES_3), średnio 906,4 μm (Ryc. 13B).

Kształt przekroju igły (cecha 18) określany jako stosunek wysokości do szerokości mierzony na przekroju poprzecznym igły waha się pomiędzy wartościami od 0,5 (UA) do 0,6 (ES_2) (Ryc. 13C). Wyjątkowo wypukłą igłę odnalazłam w populacji z Sierra de Gúdar, Puerto de San Rafael (ES_2), gdzie współczynnik kształtu wyniósł 1,1 a najbardziej spłaszczoną igłę w populacji z Sierra de Cebollera (ES_5), gdzie ten współczynnik wyniósł 0,4.

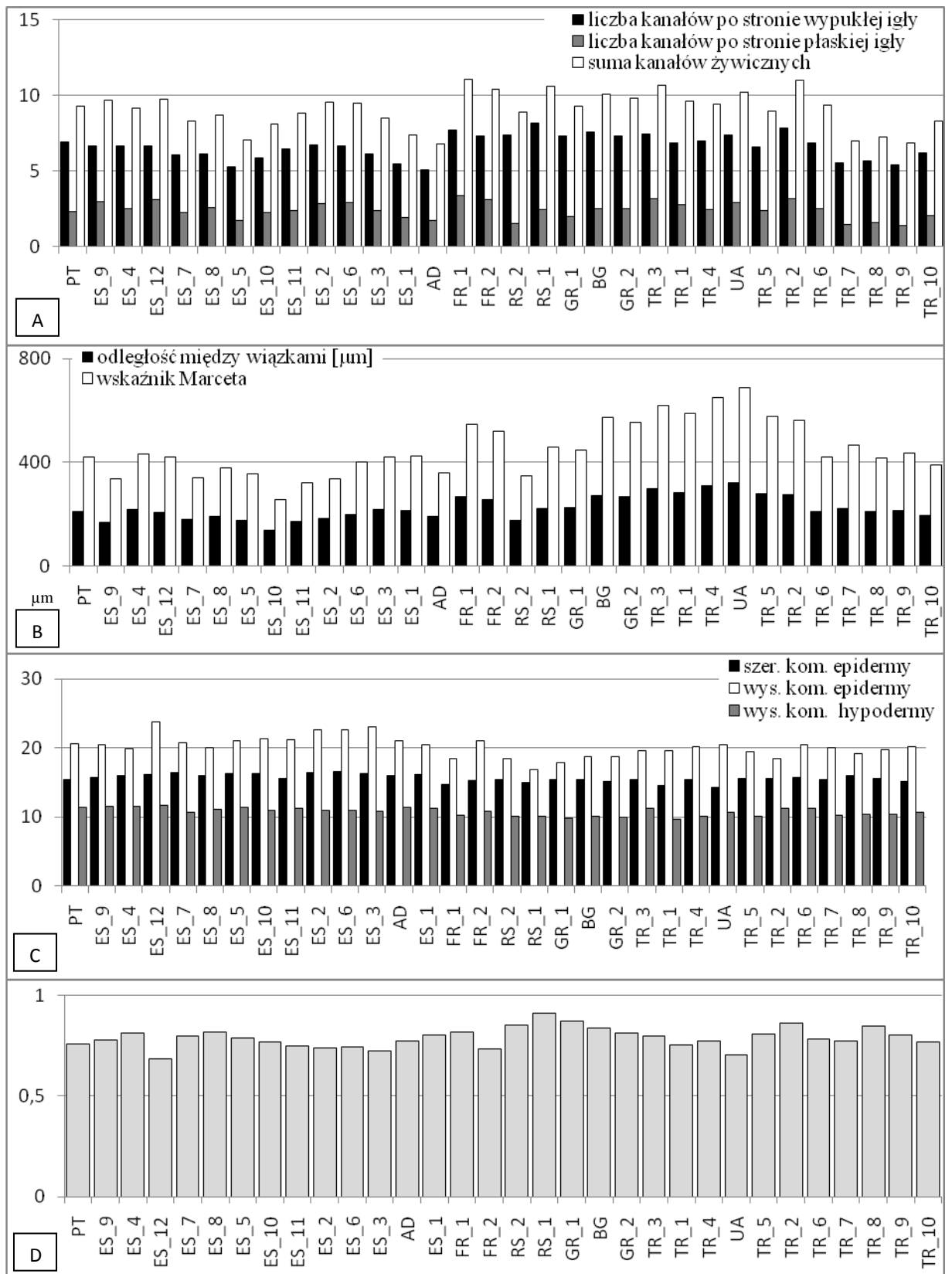
Długość igły (cecha 1) jest cechą, która nie różnicuje populacji z Półwyspu Iberyjskiego, Bałkańskiego, Masywu Centralnego, Anatolii i Półwyspu Krymskiego. Ponadto zaobserwowałam, iż w populacjach pochodzących z tych regionów, brak wyraźnych różnic między szerokością i wysokością przekroju igieł. Natomiast kształt tych przekrojów (cecha 18) wykazuje statystycznie istotne różnice pomiędzy regionami (refugiami). Populacje z Półwyspu Iberyjskiego odznaczają się najbardziej wypukłymi igłami, populacje z Półwyspu Krymskiego charakteryzują się najbardziej płaskimi igłami, a ich kształt na przekroju jest statystycznie istotnie różny od kształtów przekrojów igieł w populacjach w pozostałych refugiach. Pod względem tej cechy igły z Masywu Centralnego, Półwyspu Bałkańskiego i Azji Mniejszej nie różnią się statystycznie istotnie (Tab. Wyn.1).

Igły badanych osobników sosny zwyczajnej charakteryzują się dużą liczbą kanałów żywicznych (cecha 8). Średnio jest ich 9,0 na jednym przekroju, z czego 0-8 przypada na płaską stronę igły (cecha 7), a 2-14 na wypukłą (cecha 6). Najmniej kanałów żywicznych (średnio 6,8) miały igły pochodzące z Andory (AD), natomiast najwięcej (średnio 11,1) z Masywu Centralnego (FR_1) (Ryc. 14A).

Populacja hiszpańska z Gór Iberyjskich (ES_10) charakteryzuje się igłami o najbardziej zbliżonych do siebie wiązkach przewodzących - średnio 139,1 μm (cecha 11) i najniższej wartości wskaźnika Marceta - 257,7 μm (cecha 15). Największe wartości tych dwu cech cechują populację krymską (UA) - 322,1 μm i 689,4 (Ryc. 14B).



Rycina 13. Średnie wartości analizowanych cech igieł: A. długość igieł (cecha 1); B. szerokość i wysokość igły na przekroju poprzecznym (cechy 9 i 10); C. kształt igły (cecha 18). Akronimy populacji jak w Tab. 1

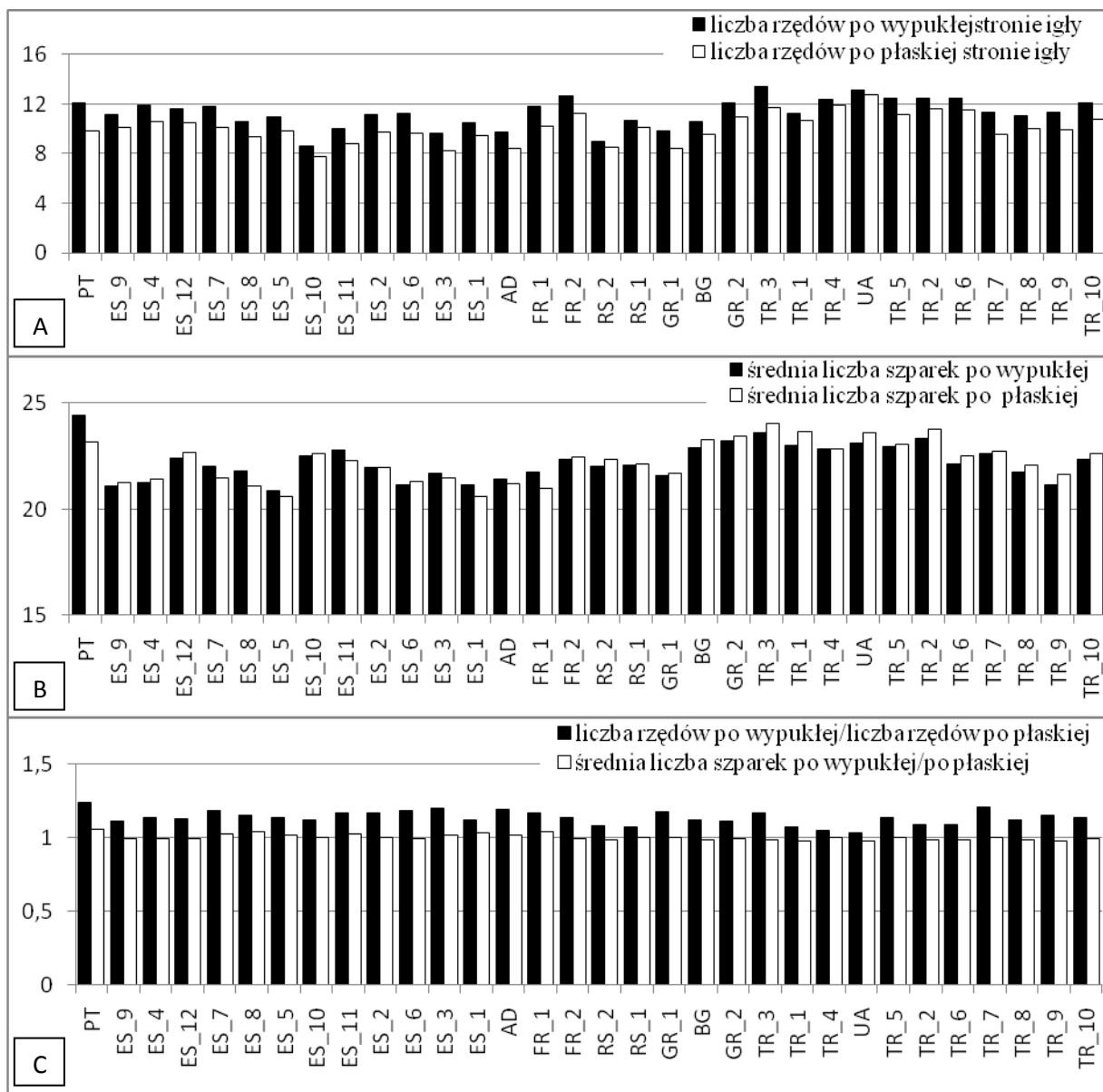


Rycina Wyn.2. Średnie wartości cech igieł: A. liczba kanałów żywicznych (cechy: 6, 7 i 8); B. odległość między wiązkami i wskaźnik Marceta (cechy 11 i 15); C. wymiary komórki epidermy i hypodermy (cechy: 12, 13 i 14); D. kształt komórki epidermy (cecha 19). Akronimy populacji jak w Tab. 1

Wymiary komórek epidermy i hipodermy (cechy: 12, 13, 14 i 19) wyróżniają populacje z Sierra de Baza (ES_12) i jedną populację z Serbii (RS_1). Komórki skórki na przekrojach poprzecznych w populacji z Sierra de Baza (ES_12) są najwyższe: komórki epidermy (cecha 10) wynoszą średnio 23,8 μm , a komórki hipodermy (cecha 14) 11,7 μm . Współczynnik kształtu komórek epidermy dla tej populacji (cecha 19) przyjmuje wartość 0,7. Igły z Serbii, natomiast cechują się najniższymi komórkami epidermy; ich kształt jest prawie kwadratowy. Wysokość komórek epidermy (cecha 10) w igłach serbskich wynosi średnio 16,8 μm , a współczynnik kształtu (cecha 19) 0,9 (Ryc. 14C i D).

Kształt komórki epidermy (cecha 19) nie różni na poziomie statystycznie istotnym populacji *Pinus sylvestris* z Półwyspu Iberyjskiego od populacji z Masywu Centralnego ani populacji z Masywu Centralnego od populacji z Anatolii. Cecha ta statystycznie istotnie wyróżnia jedynie populacje pochodzące z Półwyspu Bałkańskiego i Półwyspu Krymskiego. Przy czym sosny z Półwyspu Iberyjskiego i Krymskiego różnią się statystycznie istotnie od pozostałych regionów tylko szerokością komórki epidermy (cecha 12), brak jednak między nimi a pozostałymi populacjami statystycznie istotnych różnic w wysokościach komórek epidermy (także hipodermy) (cechy 12 i 14) (Tab. 7).

Przeciętne liczby rzędów aparatów szparkowych oraz liczby aparatów szparkowych wahają się od 8,6 do 13,4 (cecha 2) i od 7,8 do 12,7 (cecha 3) oraz od 20,8 do 24,4 (cecha 4) i od 20,6 do 24,0 (cecha 5). Analizując średnią liczbę szparek po stronie wypukłej (cecha 4) regionami, wykazałam, że populacje z Półwyspu Iberyjskiego nie różnią się statystycznie istotnie od tych z Masywu Centralnego. Różnią się natomiast od populacji z pozostałych regionów. Populacje z Masywu Centralnego dodatkowo nie różnią się statystycznie istotnie od bałkańskich, a te od populacji z Anatolii i Krymu. Inny obraz otrzymujemy w wyniku analizy średniej liczby szparek po stronie płaskiej (cecha 5), gdzie pomiędzy regionami zachodnimi (Półwysep Iberyjski i Masyw Centralny) i wschodnimi (Półwysep Bałkański, Azja Mniejsza i Półwysep Krymski) istnieją statystycznie istotne różnice (Tab. 7). Również stosunki tych cech, czyli liczba rzędów po wypukłej/liczby rzędów po płaskiej stronie igły i średnia liczba szparek po wypukłej/średniej liczby szparek po płaskiej dają bardzo podobny obraz zróżnicowania (Ryc. 15, Tab. 7).



Rycina 15. Średnie wartości analizowanych cech igieł: A. liczba rzędów szparek po wypukłej i płaskiej stronie igły (cecha 2 i 3); B. liczba szparek po wypukłej i płaskiej stronie igły (cecha 4 i 5); C. liczba rzędów szparek po wypukłej/liczba rzędów szparek po płaskiej i średnia liczba szparek po wypukłej/średnia liczba szparek po płaskiej igły (cechy 16 i 17). Akronimy populacji jak w Tab. 1

Tabela 7. Wynik testu Tukeya dla refugium w oparciu o 19 cech igieł, na tych samych poziomach zaznaczono brak statystycznie istotnych różnic między grupami populacji z porównywanych regionów

Nr	Cecha	Półwysep Iberyjski	Masyw Centralny	Półwysep Bałkański	Anatolia	Półwysep Krymski
1	Długość igły					
2	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły					
3	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły					
4	Średnia liczba aparatów szarkowych po stronie wypukłej igły					
5	Średnia liczba aparatów szarkowych po stronie płaskiej igły					
6	Liczba kanałów żywicznych po stronie wypukłej igły					
7	Liczba kanałów żywicznych po stronie płaskiej igły					
8	Suma kanałów żywicznych					
9	Szerokość igły na przekroju poprzecznym					
10	Wysokość igły na przekroju poprzecznym					
11	Odległość między wiązkami przewodzącymi					
12	Średnia szerokość komórki epidermy					
13	Średnia wysokość komórki epidermy					
14	Średnia wysokość komórki hypodermy					
15	Wskaźnik Marceta					
16	Liczba rzędów po wypukłej / Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły					
17	Średnia liczba szparek po wypukłej/średnia liczba szparek po płaskiej					
18	Kształt igły					
19	Kształt komórki epidermy					

Hierarchiczna analiza wariancji wykazała, że z wysoce istotnym prawdopodobieństwem ($F < 0,01$) cechy igieł wyodrębnione w tabeli 8 mogą być powodem różnic między obserwowanymi średnimi grupowymi. Wybrane cechy charakteryzują się większym procentem oszacowanej wariancji między regionami niż między populacjami w regionach, co oznacza, że wyznaczone regiony (refugia) różnią się między sobą, natomiast zróżnicowanie pomiędzy populacjami z tych regionów jest mniejsze. Procent oszacowanej wariancji względem całkowitej wariancji wewnątrz populacji w odniesieniu do wszystkich cech jest wysoki (Tab. 8).

Tabela 8. Cechy igieł o wariancji międzyregionalnej większej niż wariancja międzypopulacyjna

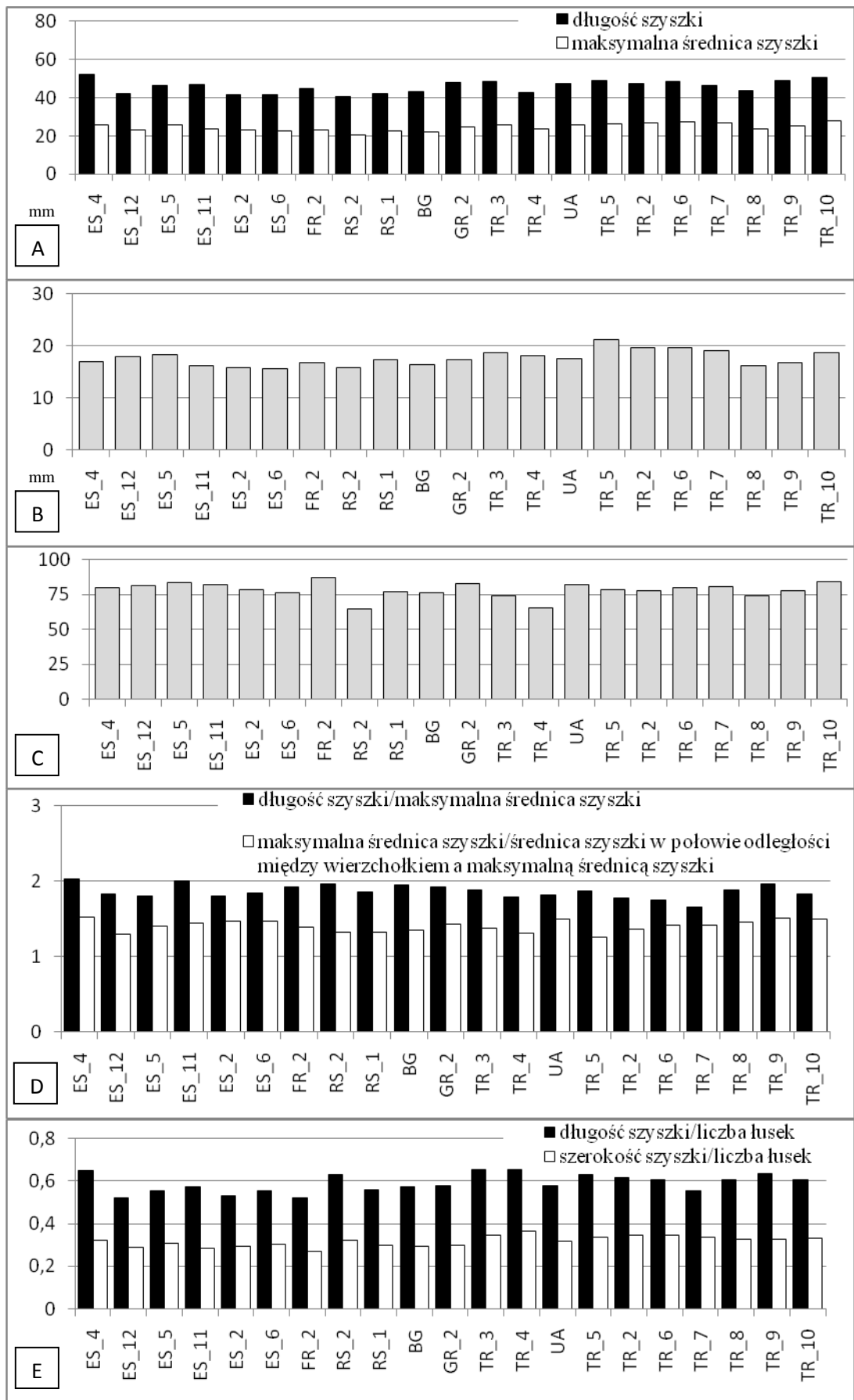
cecha	składnik wariancji	%	SS	MS	df	statystyka F	Prob > F
liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły	między regionami	17,85	3149,52	787,38	4	6,64	0,0007*
	między populacjami w regionach	15,66	3145,38	116,49	27	12,16	<,0001*
	wewnątrz populacji	35,30	8809,35	9,59	919	6,62	0,0000*
	reszta	31,19					
	całkowita	100					
odległość między wiązkami przewodzącymi	między regionami	23,95	5208549	1302137	4	7,64	0,0003*
	między populacjami w regionach	17,94	4521453	167461	27	12,88	<,0001*
	wewnątrz populacji	41,41	1,20E+07	13013	919	13,33	0,0000*
	reszta	16,69					
	całkowita	100					
średnia szerokość komórki epidermy	między regionami	8,97	988,11	247,03	4	15,10	<,0001*
	między populacjami w regionach	2,24	436,31	16,16	27	2,84	<,0001*
	wewnątrz populacji	22,71	5233,18	5,69	919	2,71	<,0001*
	reszta	66,08					
	całkowita	100					
średnia wysokość komórki epidermy	między regionami	17,75	6212,24	1553,06	4	10,61	<,0001*
	między populacjami w regionach	8,92	3901,44	144,50	27	9,25	<,0001*
	wewnątrz populacji	21,59	14343,80	15,63	918	3,073	<,0001*
	reszta	51,74					
	całkowita	100					
średnia wysokość komórki hypodermy	między regionami	5,20	950,15	237,54	4	10,35	<,0001*
	między populacjami w regionach	2,14	613,23	22,71	27	3,42	<,0001*
	wewnątrz populacji	9,35	6092,55	6,64	918	1,56	<,0001*
	reszta	83,31					
	całkowita	100					
współczynnik Marceta	między regionami	25,51	2,93E+07	7316117	4	8,64	0,0001*
	między populacjami w regionach	16,55	2,25E+07	833027	27	12,18	<,0001*
	wewnątrz populacji	40,35	6,29E+07	68462,60	919	12,40	0,0000*
	reszta	17,59					
	całkowita	100					
średnia liczba szparek po wypukłej/średnia liczba szparek po płaskiej	między regionami	2,62	0,78	0,19	4	5,47	0,0024*
	między populacjami w regionach	2,27	0,95	0,04	27	3,51	<,0001*
	wewnątrz populacji	9,53	9,18	0,01	919	1,55	<,0001*
	reszta	85,58					
	całkowita	100					
wysokość igły/szerokość igły	między regionami	11,43	0,90	0,23	4	6,41	0,0009*
	między populacjami w regionach	9,73	0,94	0,04	27	6,75	<,0001*
	wewnątrz populacji	42,90	4,72	0,01	919	6,93	0,0000*
	reszta	35,95					
	całkowita	100					

średnia szerokość komórki epidermy/średnia wysokość komórki epidermy	między regionami	8,40	5,73	1,43	4	7,08	0,0005*
	między populacjami w regionach	6,38	5,39	0,20	27	6,82	<,0001*
	wewnątrz populacji	19,16	26,88	0,03	918	2,44	<,0001*
	reszta	66,06					
	całkowita	100					
liczba warstw komórek sklerenchymatycznych nad floemem	między regionami	30,20	282,53	70,63	4	10,75	<,0001*
	między populacjami w regionach	15,73	174,32	6,46	27	17,07	<,0001*
	wewnątrz populacji	22,69	347,85	0,39	919	4,59	<,0001*
	reszta	31,39					
	całkowita	100					
typ komórek wokół kanałów żywicznych							
komórki cienkościenne z dużym światłem komórkowym	między regionami	32,89	758772	189693	4	10,50	<,0001*
	między populacjami w regionach	17,60	479626	17763,90	27	17,19	<,0001*
	wewnątrz populacji	27,88	950584	1034,37	919	7,41	0,0000*
	reszta	21,62					
	całkowita	100					
typ komórek pośrednich	między regionami	32,01	360315	90078,70	4	11,36	<,0001*
	między populacjami w regionach	15,69	210432	7793,80	27	17,03	<,0001*
	wewnątrz populacji	23,15	420994	458,10	919	4,95	<,0001*
	reszta	29,14					
	całkowita	100					

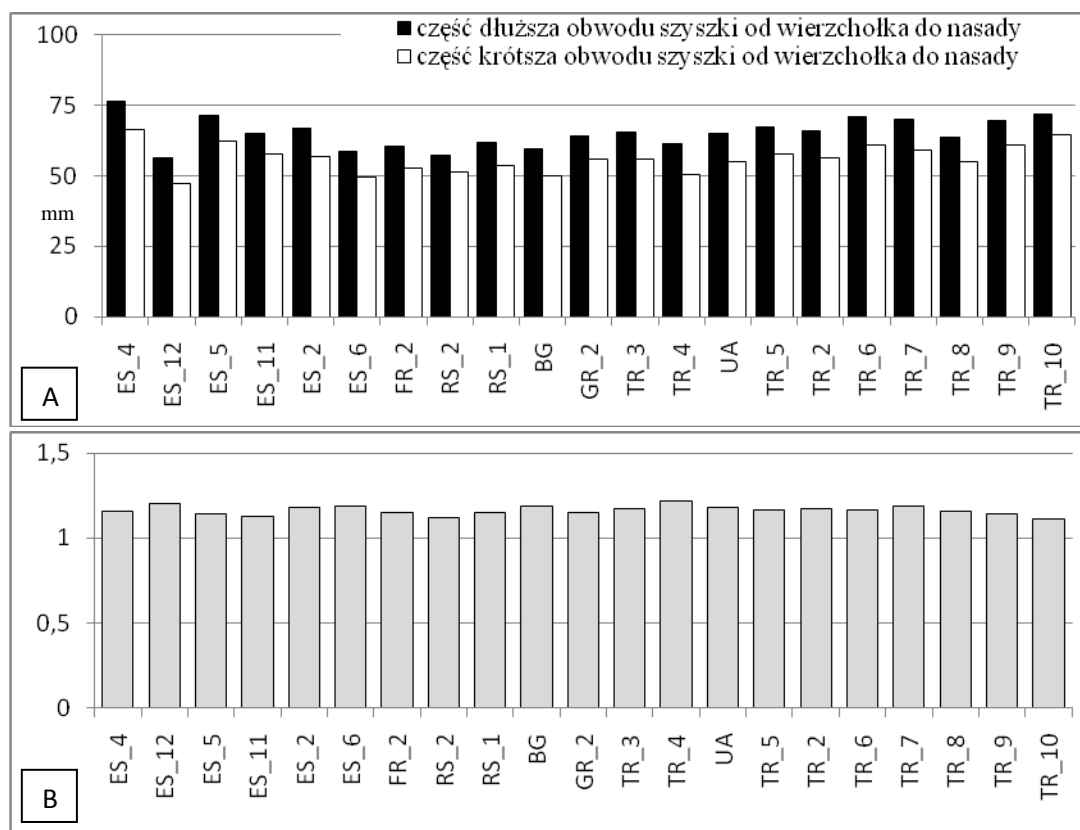
% - procent oszacowanej wariancji względem całkowitej wariancji, SS – suma kwadratów odchyłeń, MS - błąd średniokwadratowy, df – liczba stopni swobody

Próbkę 1024 szyszek z 21 populacji przebadalam, wykorzystując dziesięć cech mierzalnych i osiem przeliczeniowych. Wśród nich wyróżnia się populacja serbska (RS_2), która ma najkrótsze (40,6 mm) i najwęższe (20,7 mm) szyszki o najmniejszej liczbie łusek (przeciętnie 64,4). Najdłuższe szyszki (cecha 1), średnio 52,0 mm, należą do populacji z Sierra de Neila w Hiszpanii (ES_4), a najszersze (cecha 2) 27,8 mm, do tureckiej populacji rosnącej w pobliżu Karsu (TR_10). Największą liczbą łusek (cecha 3) charakteryzują się szyszki z Masywu Centralnego we Francji – przeciętnie 86,9 łusek na szyszkę (Ryc. 16A i C).

Szyszki *Pinus sylvestris* są wyraźnie wydłużone; stosunek długości do maksymalnej szerokości (cecha 11) przyjmuje przeciętne wartości od 1,7 w populacji tureckiej (TR_7) do 2,0 w populacji z Sierra de Neila w Hiszpanii (ES_4). Populacja ta ma również najwyższą wartość stosunku maksymalnej średnicy szyszki do średnicy szyszki w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki (1,5) (cecha 18). Oznacza to, że jej szyszki są raczej stożkowate niż owoidalne. Najniższa wartość tej cechy (1,3) i jednocześnie największa przeciętna średnica szyszki (21,2 mm), mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki (cecha 8), charakteryzuje szyszki z północnej Turcji (TR_5) (Ryc. 16B i D).



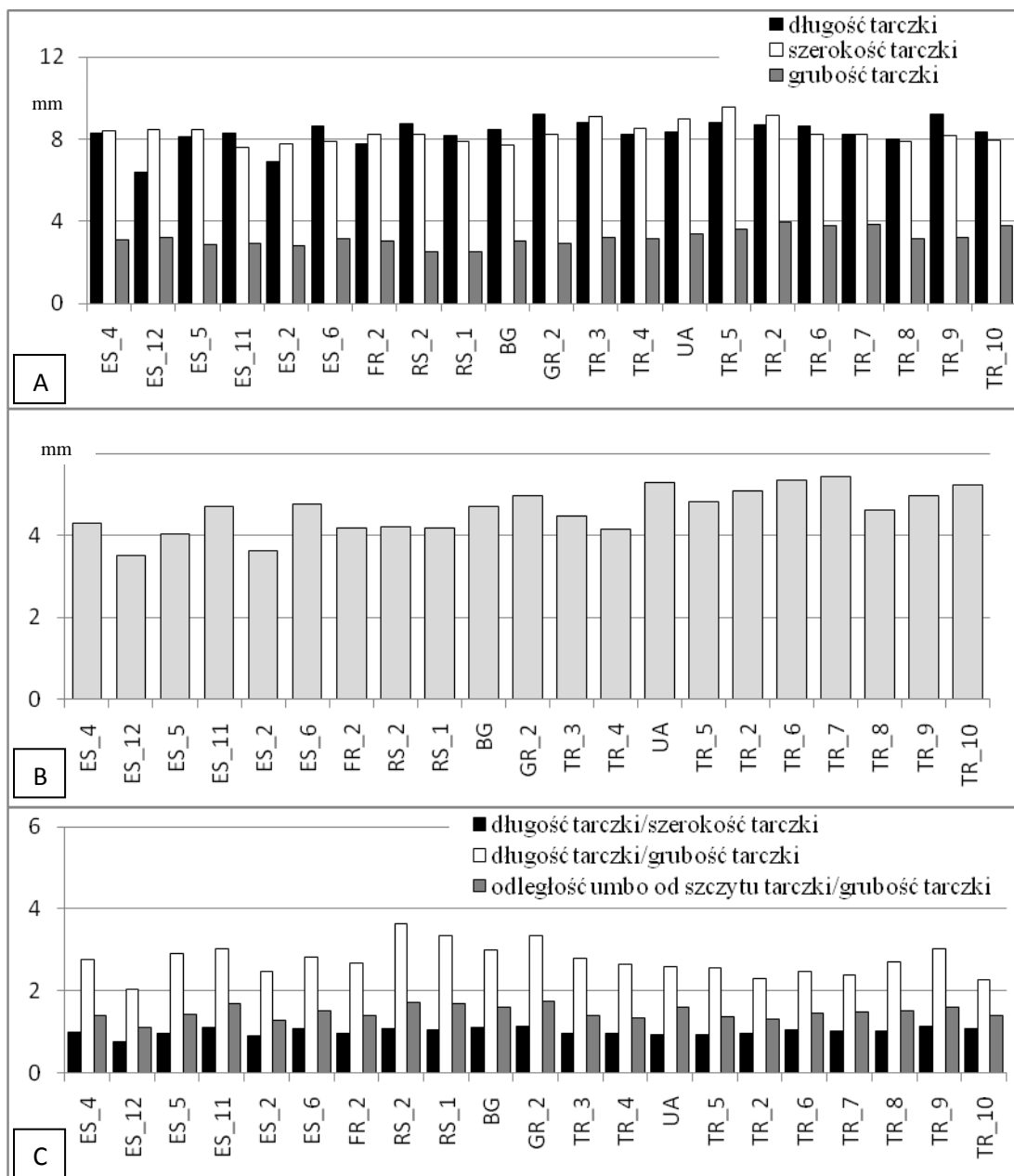
Rycina 16. Średnie wartości analizowanych cech szyszek: A. długość i maksymalna średnica (cechy 1 i 2); B. średnica mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą (cecha 8); C. liczba łusek (cecha 3); D. cechy kształtu (cechy 11 i 18); E. długość/liczbę łusek i szerokość/liczbę łusek (cechy 12 i 16). Akronimy populacji jak w Tab. 1



Rycina 17. Średnie wartości analizowanych cech szyszek: A. części obwodu szyszki (cechy 9 i 10); B. asymetria szyszki (cecha 15). Akronimy populacji jak w Tab. 1

Symetria szyszki obliczana ze stosunku dłuższej do krótszej części podłużnego obwodu szyszki (cecha 15) wynosi przeciętnie od 1,1 do 1,2, co oznacza, że szyszki sosny są lekko asymetryczne (Ryc. 17A i B). Tarczki łusek są dość duże, o średniej długości (cecha 4) od 6,4 mm w populacji z Sierra de Baza (ES_12) do 9,2 mm w populacji Ano Vrandou z Grecji (GR_2) i średniej szerokości (cecha 5) od 7,6 mm w populacji z Cuenci w Hiszpanii (ES_11) do 9,6 mm w tureckiej populacji z okolic Sinop (TR_5). U szyszek sosny zwyczajnej brak jest wyraźnie odstających apofiz, co uwidacznia się między innymi w grubości tarczki i odległości od wierzchołka tarczki do umbo (cechy 6 i 7). Grubość tarczki przyjmuje przeciętne wartości od 2,5 do 4,0 mm, a odległość umbo od szczytu tarczki od 3,5 do 5,4 mm (Ryc. 18A i B). Stosunki tych cech: długość tarczki/szerokość tarczki (cecha 13), długość tarczki/grubość tarczki (cecha 14), odległość umbo od szczytu tarczki/grubość tarczki (cecha 17) uwidaczniają wyjątkowość populacji z Sierra de Baza (ES_12), która charakteryzuje się najniższymi wartościami tych cech (Ryc. 18C).

Wynik testu Tukeya dla cech szyszek wskazuje na brak istotnych różnic pomiędzy regionami w: długości (cecha 1), liczbie łusek (cecha 3), kształcie (cecha 11) czy asymetrii (cecha 15). W odniesieniu do szerokości szyszki (cecha 2) i odległości umbo od szczytu tarczki (cecha 7) uwidacznia jednocześnie podział populacji na dwie wyraźnie różniące się terytorialnie grupy: Półwysep Iberyjski, Masyw Centralny i Bałkany z jednej strony oraz Anatolii i Półwysep Krymski z drugiej (Tab. 9).



Rycina 18. Średnie wartości analizowanych cech szyszek: A. cechy tarczki (cechy: 4, 5 i 6); B. odległość umbo od szczytu tarczki (cecha 7); C. przeliczeniowe cechy tarczki (cechy: 13,14 i 17). Akronimy populacji jak w Tab. 1

Tabela 9. Wynik testu Tukeya dla refugiów w oparciu o 18 cech szyszek, na tych samych poziomach zaznaczono brak statystycznie istotnych różnic między grupami populacji z porównywanych regionów

Nr	Cecha	Półwysep Iberyjski	Masyw Centralny	Półwysep Bałkański	Anatolia	Półwysep Krymski
1	Długość szyszki					
2	Maksymalna średnica szyszki					
3	Liczba łusek					
4	Długość tarczki					
5	Szerokość tarczki					
6	Grubość tarczki					
7	Odległość umbo od szczytu tarczki					
8	Średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki					
9	Część obwodu szyszki od wierzchołka do nasady - w przypadku szyszek niesymetrycznych - część dłuższa					
10	Część obwodu szyszki od wierzchołka do nasady - w przypadku szyszek niesymetrycznych - część krótsza					
11	Kształt szyszki					
12	Długość szyszki / Liczba łusek					
13	Długość tarczki / Szerokość tarczki					
14	Długość tarczki / Grubość tarczki					
15	Asymetria szyszki					
16	Szerokość szyszki / Liczba łusek					
17	Odległość umbo od szczytu tarczki / Grubość tarczki					
18	Maksymalna średnica szyszki / Średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki					

Hierarchiczna analiza wariancji wykazała z wysoce istotnym prawdopodobieństwem ($F < 0,01$), że stosunek szerokości szyszki do liczby łusek (cecha 16) może być powodem różnic między obserwowanymi grupami populacji (Tab. 10). Charakteryzuje się ona wielokrotnie większym procentem oszacowanej wariancji między regionami niż między populacjami w regionach, co oznacza, że populacje pochodzące z różnych regionów (refugiów) różnią się znacznie, natomiast w obrębie regionów różnice są mniejsze. Procent oszacowanej wariancji względem całkowitej wariancji wewnątrz populacji we wszystkich cechach jest wysoki (Tab. 10).

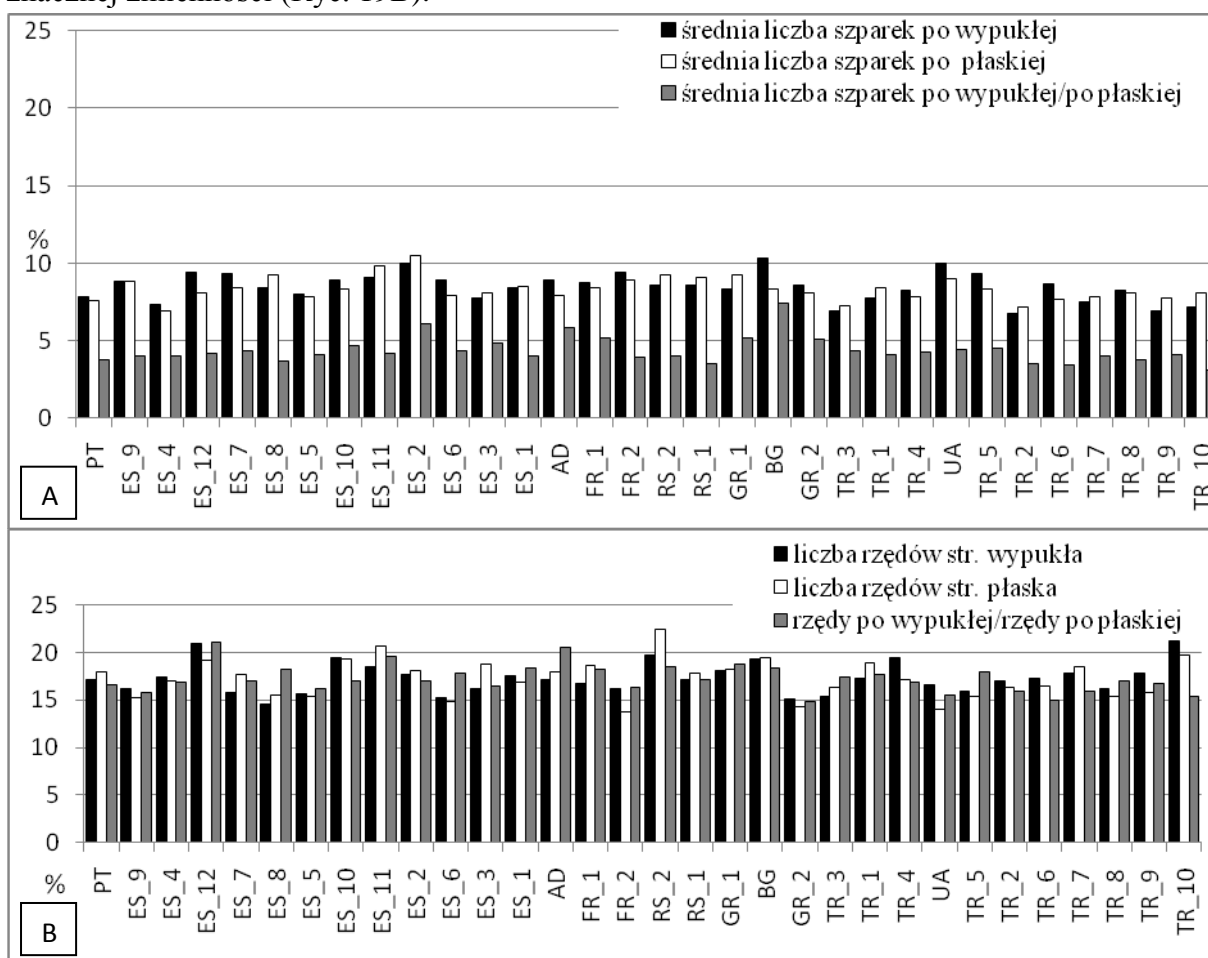
Tabela 10. Cechy szyszek o wariancji międzyregionalnej większej niż wariancja międzypopulacyjna

Cecha	składnik wariancji	%	SS	MS	df	statystyka F	Prob > F
szerokość szyszek/liczba łusek	między regionami	30,35	0,47	0,12	4	14,77	<,0001*
	między populacjami w regionach	6,69	0,13	0,01	16	6,19	<,0001*
	reszta	62,96					
	całkowita	100					

% - procent oszacowanej wariancji względem całkowitej wariancji, SS – suma kwadratów odchyłeń, MS - błąd średniokwadratowy, df – liczba stopni swobody

4.1.1.1. Zmienność cech igieł

Najmniej zmiennymi cechami igieł sosny zwyczajnej są liczby aparatów szparkowych (cechy: 4, 5 i 17); ich współczynniki zmienności obliczono na 3 – 10% (Ryc. 19A). Liczby rzędów aparatów szparkowych (cechy 2, 3 i 16) są cechami o znacznej zmienności (Ryc. 19B).

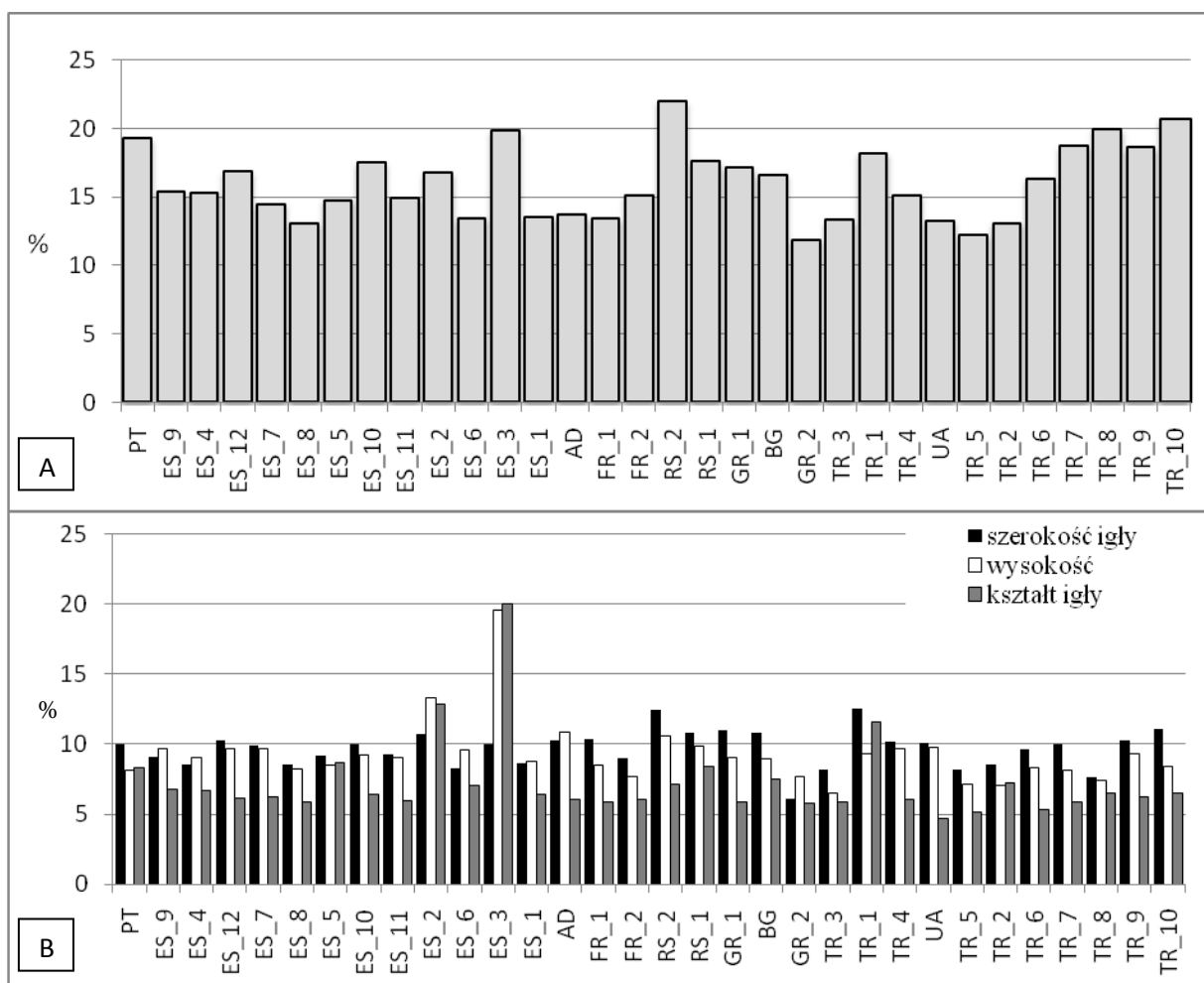


Rycina 19. Wartości współczynnika zmienności: A. średniej liczby aparatów szparkowych (cechy: 4, 5 i 17), B. średniej liczby rzędów aparatów szparkowych (cechy: 2, 3 i 16). Akronimy populacji jak w Tab. 1

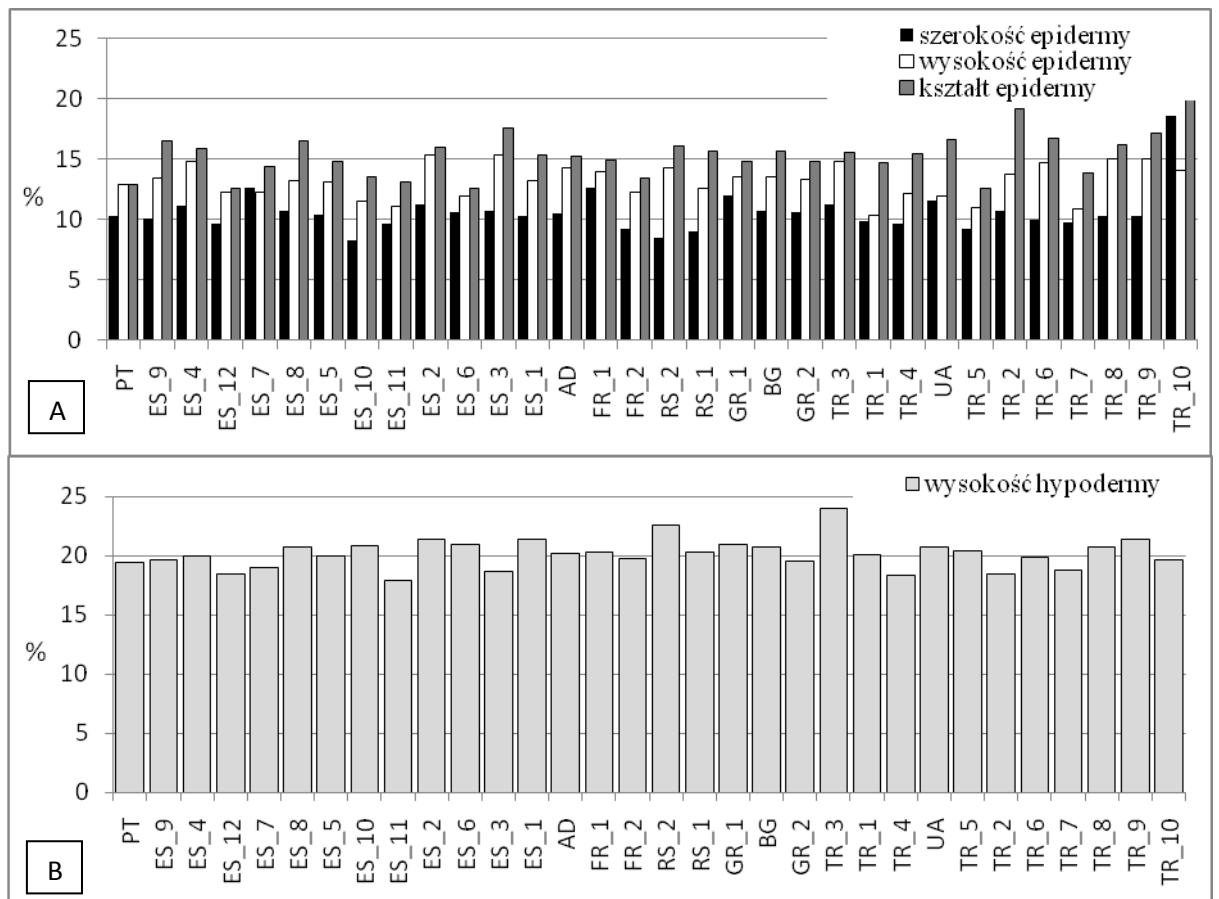
Długość igły (cecha 1) jest znacznie zmienna (Ryc. 20A), natomiast szerokość, wysokość oraz kształt przekroju igły (cechy: 9, 10 i 18) są umiarkowanie zmienne (Ryc. 20B). Wśród badanych populacji wyróżnia się jedynie populacja z Sierra de Gúdar (ES_3), u której współczynnik zmienności osiąga większe wartości w cechach związanych z wysokością igły (cechy 10 i 18).

W badanych 32 populacjach wysokość, szerokość oraz kształt komórek epidermy (cechy: 12, 13 i 19) oraz wysokość komórek hypodermy wykazują zmienność od umiarkowanej po znaczną (Ryc. 21A i B).

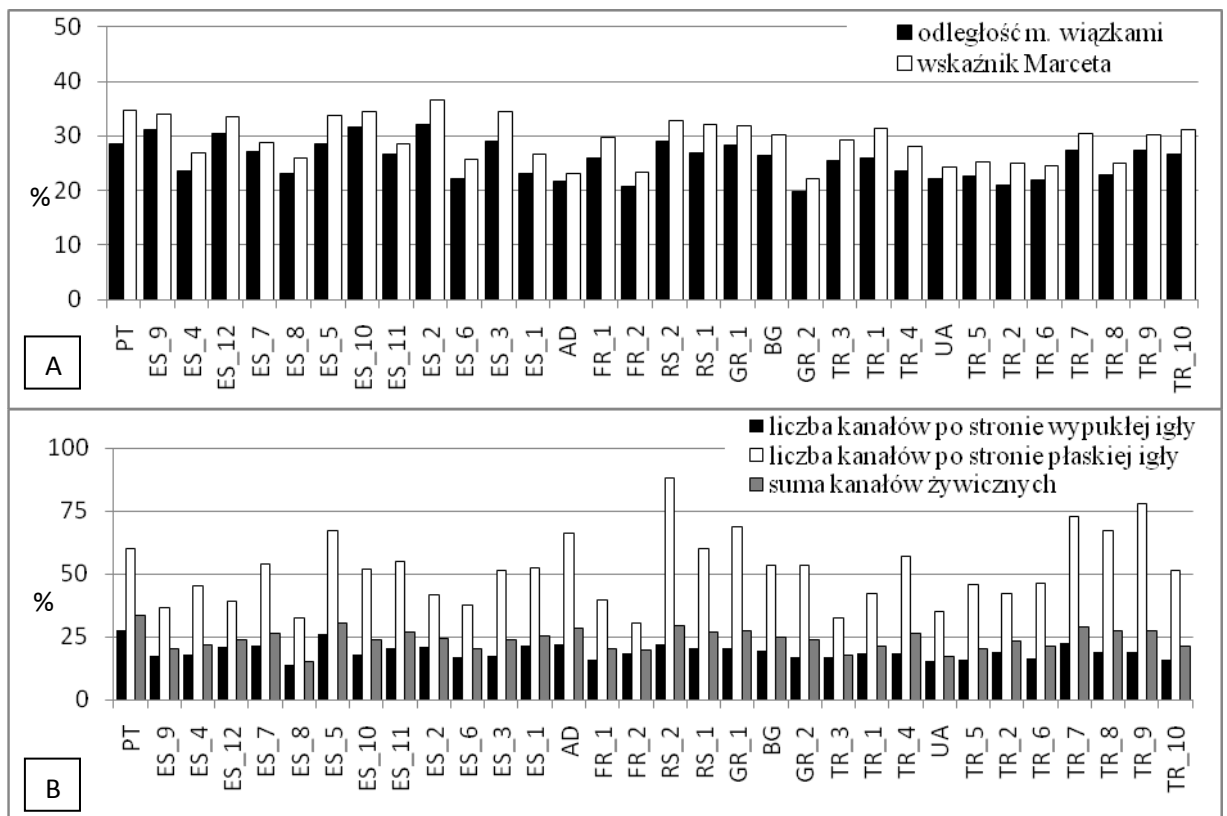
Do cech najbardziej zmiennych zaliczają się takie parametry igły jak: odległość między wiązkami (cecha 11), wskaźnik Marceta (cecha 15) oraz cechy związane z liczbą kanałów żywicznych, zwłaszcza po płaskiej stronie igły (cechy: 6, 7 i 8) (Ryc. 22 A i B).



Rycina 20. Wartości współczynnika zmienności: A. długości igły (cecha 1), B. szerokość przekroju igły, wysokość przekroju igły oraz stosunek tych cech (cechy: 9, 10 i 18). Akronimy populacji jak w Tab. 1

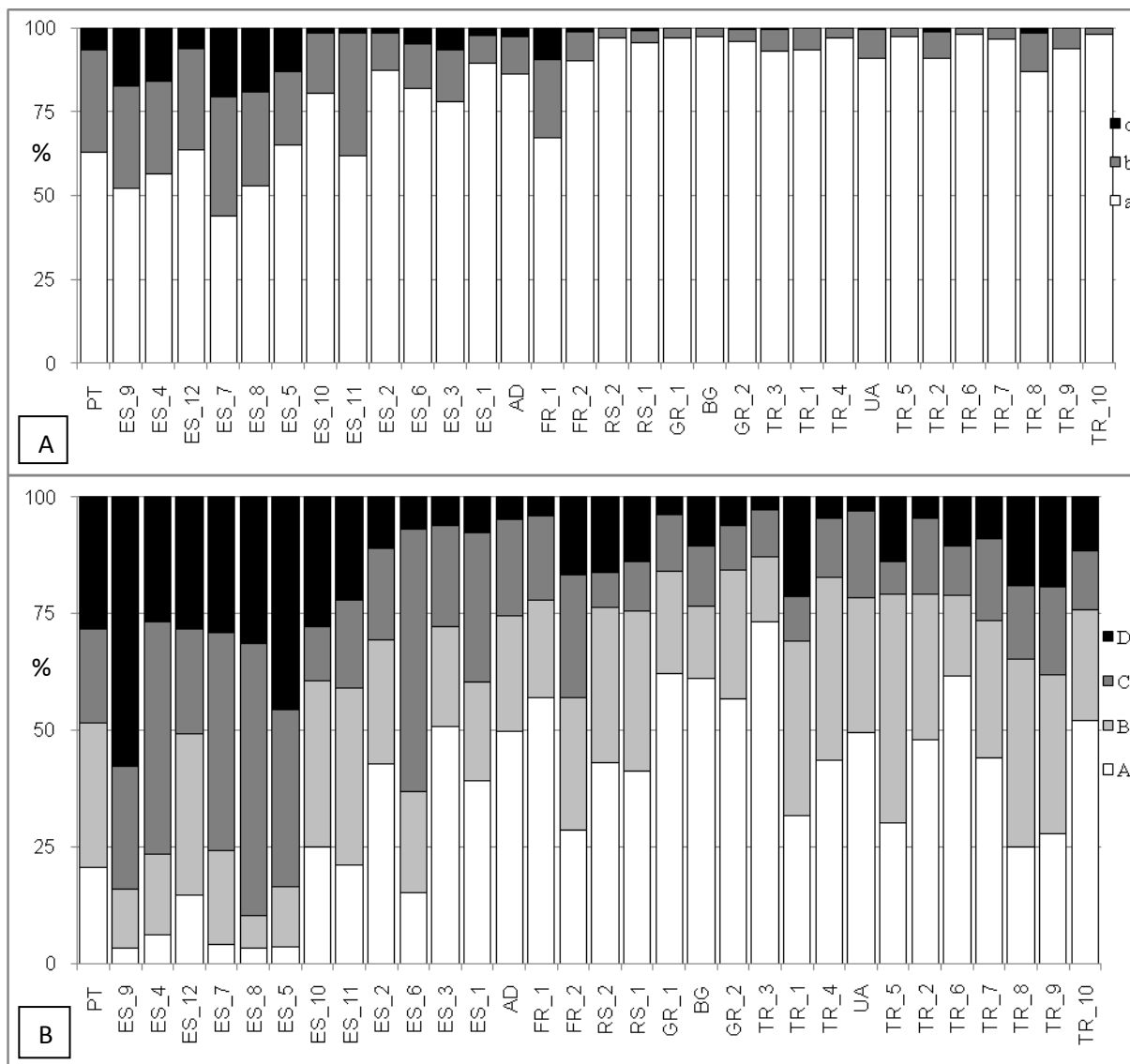


Rycina 21. Wartości współczynnika zmienności: A. parametrów komórek epidermy szparkowych (cechy: 12, 13 i 19), B. wysokość hypodermii (cecha 14). Akronimy populacji jak w Tab. 1

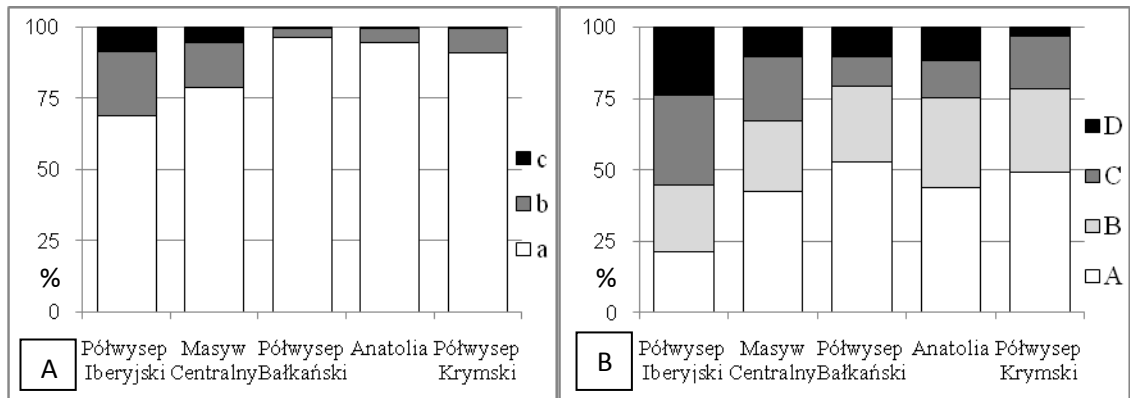


Rycina 22. Wartości współczynnika zmienności: A. odległość między wiązkami i wskaźnik Marceta (cecha 11 i 15), B. cechy związane z liczbą kanałów żywicznych na przekroju (cechy: 6, 7 i 8). Akronimy populacji jak w Tab. 1

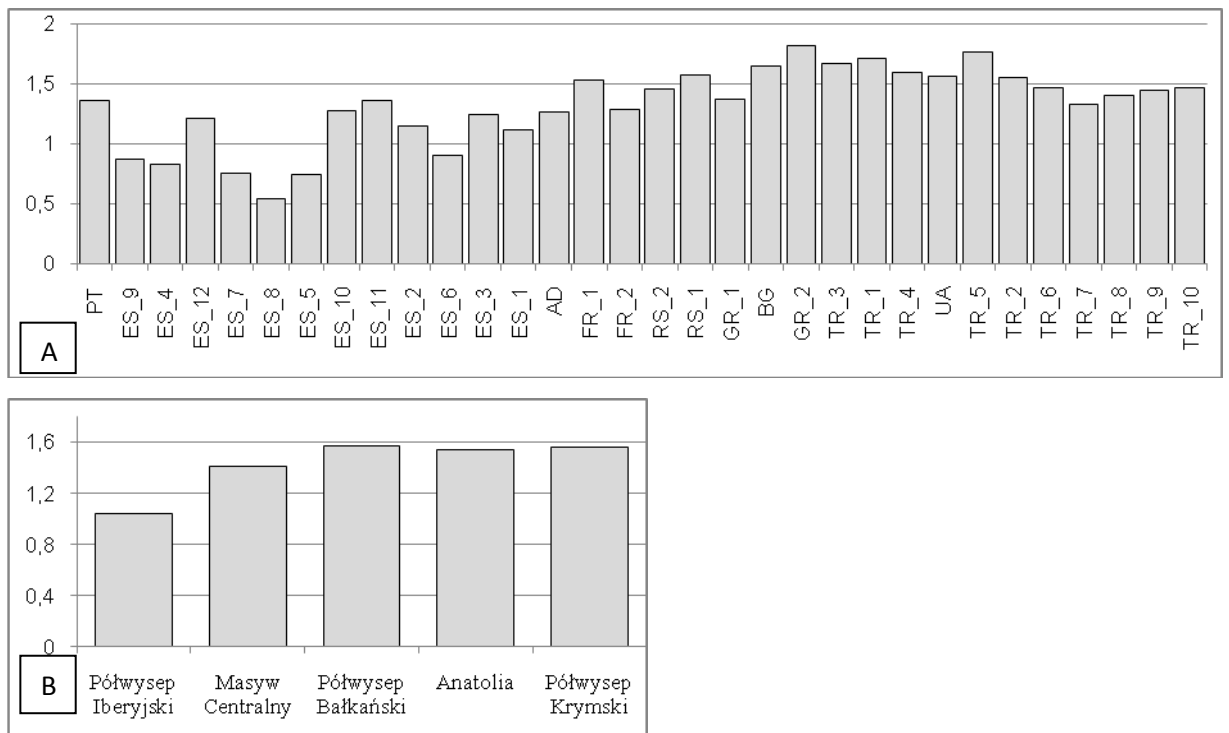
Na przekrojach poprzecznych igieł komórki sklerenchymatyczne są analizowane w trzech regionach: wokół kanałów żywicznych, między wiązkami przewodzącymi oraz jako pasmo nad nimi (Ryc. 7 i 8).



Rycina 23. Procentowy udział typów komórek sklerenchymatycznych w populacjach: A. wokół kanałów żywicznych (cecha 21) gdzie a - komórki grubościennie z małym światłem komórkowym, b - komórki pośrednie, c - komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym; B. między wiązkami przewodzącymi gdzie A - komórki grubościennie z małym światłem komórkowym, B - komórki grubościennie o pośredniej wielkości światła komórkowego, C - komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym, na przekroju owalne lub okrągłe, D - komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym o nieregularnych kształtach (cecha 22). Akronimy populacji jak w Tab. 1



Rycina 24. Procentowy udział typów komórek sklerenchymatycznych w regionach: A. wokół kanałów żywnych (cecha 21) gdzie a- komórki grubościenne z małym światłem komórkowym, b - komórki pośrednie, c - komórki cienkościenne z dużym światłem komórkowym; B. między wiązkami przewodzącymi, gdzie A - komórki grubościenne z małym światłem komórkowym, B - komórki grubościenne o pośredniej wielkości światła komórkowego, C - komórki cienkościenne z dużym światłem komórkowym, na przekroju owalne lub okrągłe, D - komórki cienkościenne z dużym światłem komórkowym o nieregularnych kształtach (cecha 22). Akronimy populacji jak w Tab. 1



Rycina 25. Liczba warstw komórek sklerenchymatycznych nad wiązkami przewodzącymi (cecha 20): A. w populacjach, B. w wybranych regionach. Akronimy populacji jak w Tab. 1

Udział grubościennych komórek sklerenchymatycznych wokół kanałów żywicznych i między wiązkami przewodzącymi (typy a i A) (cechy 21 i 22) zwiększa się z zachodu na wschód (Ryc. 23). Opisywane jako typowe dla *Pinus sylvestris* komórki grubościenne (włókna) typów a i A (odpowiednio: wokół kanałów żywicznych i między wiązkami przewodzącymi) występują w badanych populacjach w różnych proporcjach.

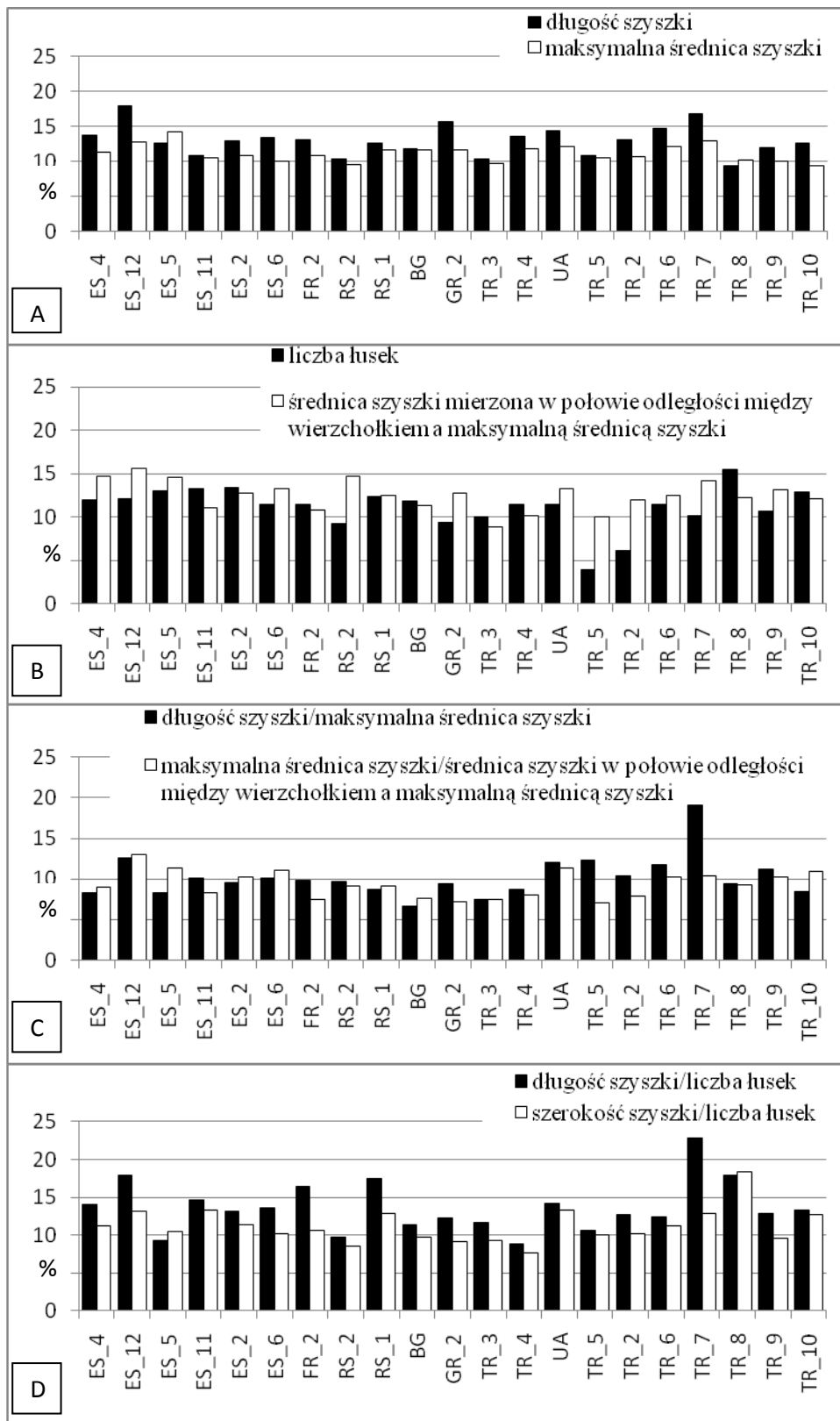
Zaskakujący jest bardzo niski (nietypowy) udział komórek grubościennych typów a i A w populacjach z Półwyspu Iberyjskiego - około 50% w przypadku kanałów żywicznych (cecha 21) i prawie 25% między wiązkami przewodzącymi (cecha 22) (Ryc. 24). Również w przypadku populacji z Półwyspu Bałkańskiego, Anatolii i Półwyspu Krymskiego udział komórek typu A między wiązkami przewodzącymi wahał się w okolicach 50%; bardziej typowy obraz obserwowałam w przypadku kanałów żywicznych (Ryc. 24B).

Ustaliłam również, że liczba warstw komórek sklerenchymatycznych jakie występują nad wiązkami przewodzącymi (cecha 20) zależy od położenia geograficznego (Ryc. 25). Populacje z Półwyspu Iberyjskiego i Masywu Centralnego charakteryzują się statystycznie istotnie mniejszą liczbą warstw od tych z Bałkanów, Anatolii czy Krymu (Ryc. 25B).

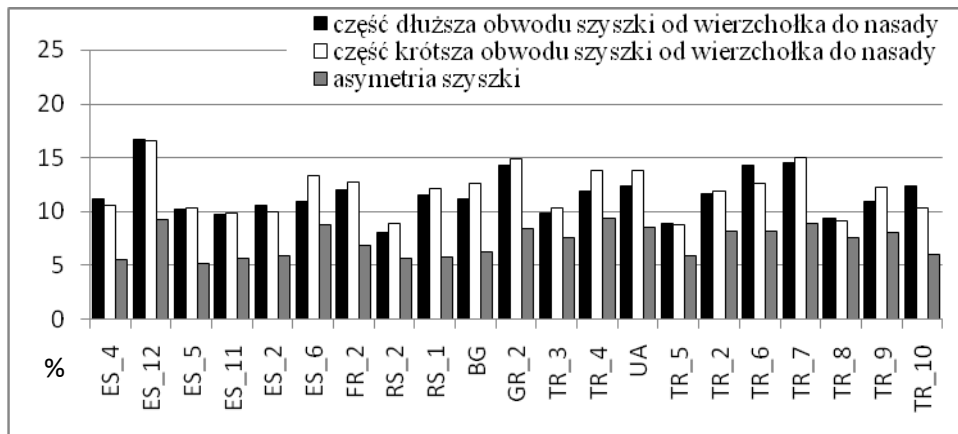
4.1.1.2. Zmienność cech szyszek

Cechy szyszki: długość (cecha 1), maksymalna średnica (cecha 2), średnica mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą (cecha 8), a także liczba łusek (cecha 3) oraz skonstruowane na ich podstawie cechy przeliczeniowe (cechy: 11, 12, 16 i 18) charakteryzują się zmiennością od umiarkowanej po znaczną (Ryc. 26A-D). Cechy obwodu szyszki (cechy 9 i 10) są również cechami o znacznej zmienności, natomiast asymetria szyszki (cecha 15) we wszystkich badanych populacjach jest umiarkowanie zmienna (Ryc. 27).

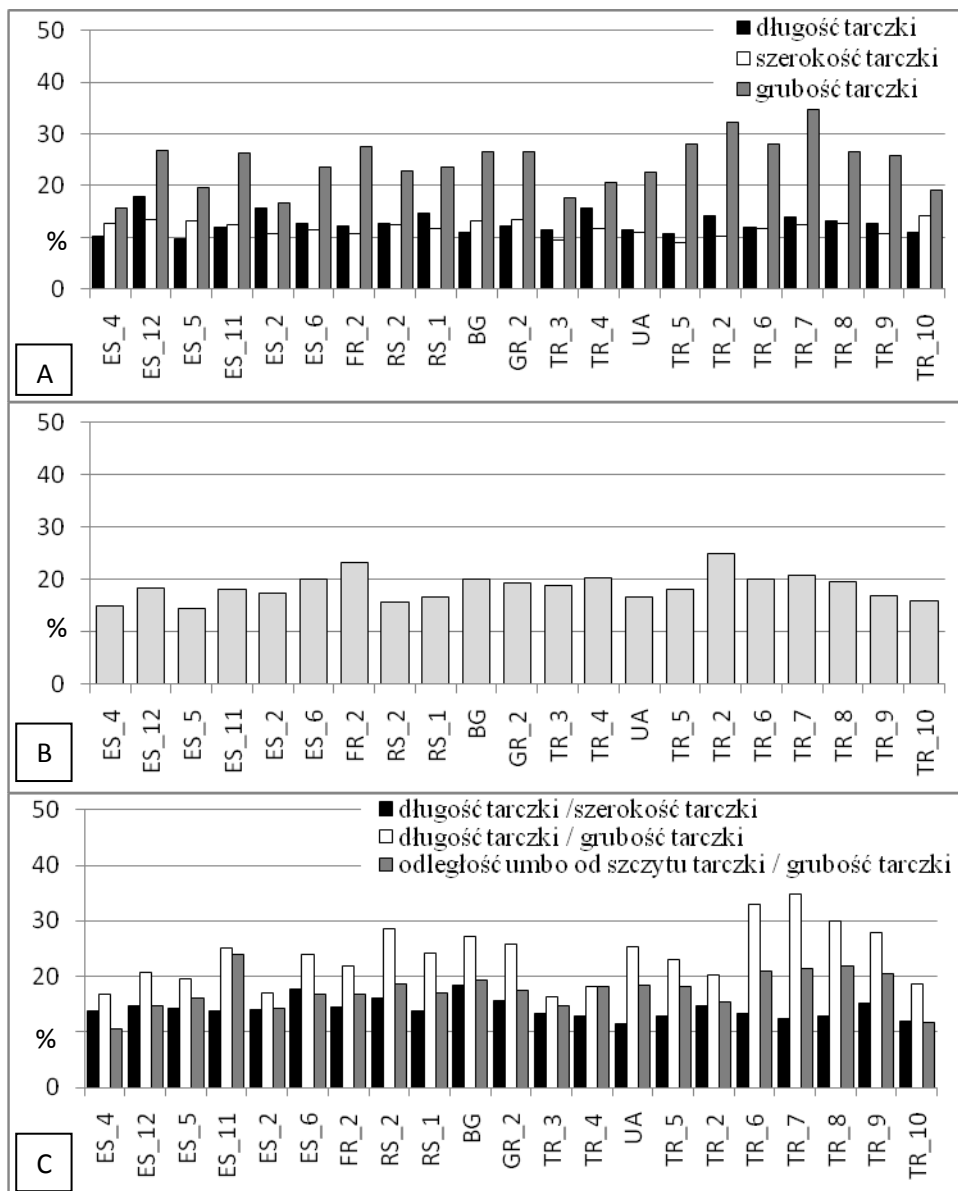
Cechy tarczki (cechy: 4, 5, 6, 7, 13, 14 i 17) charakteryzują się zmiennością od znacznej po dużą. Do najbardziej zmiennych należą grubość tarczki (cecha 6) i stosunek długości do grubości tarczki (cecha 14) (Ryc. 28A-C).



Rycina 26. Wartości współczynnika zmienności dla cech: A. długość i maksymalna średnica (cecha 1 i 2); B. średnica mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą (cecha 8) i liczba łusek (cecha 3); C. cechy kształtu (cecha 11 i 18); C. długość/liczba łusek i szerokość/liczba łusek (cechy 12 i 16). Akronimy populacji jak w Tab. 1



Rycina 27. Wartości współczynnika zmienności dla cech: A. części obwodu szyszki (cechy 9 i 10); B. asymetria szyszki (cecha 15). Akronimy populacji jak w Tab. 1



Rycina 28. Wartości współczynnika zmienności: A. cechy tarczki (cechy: 4, 5 i 6); B. odległość umbo od szczytu tarczki (cecha 7); C. przeliczeniowe cechy tarczki (cechy: 13, 14 i 17). Akronimy populacji jak w Tab. 1

4.2. Zależności cech

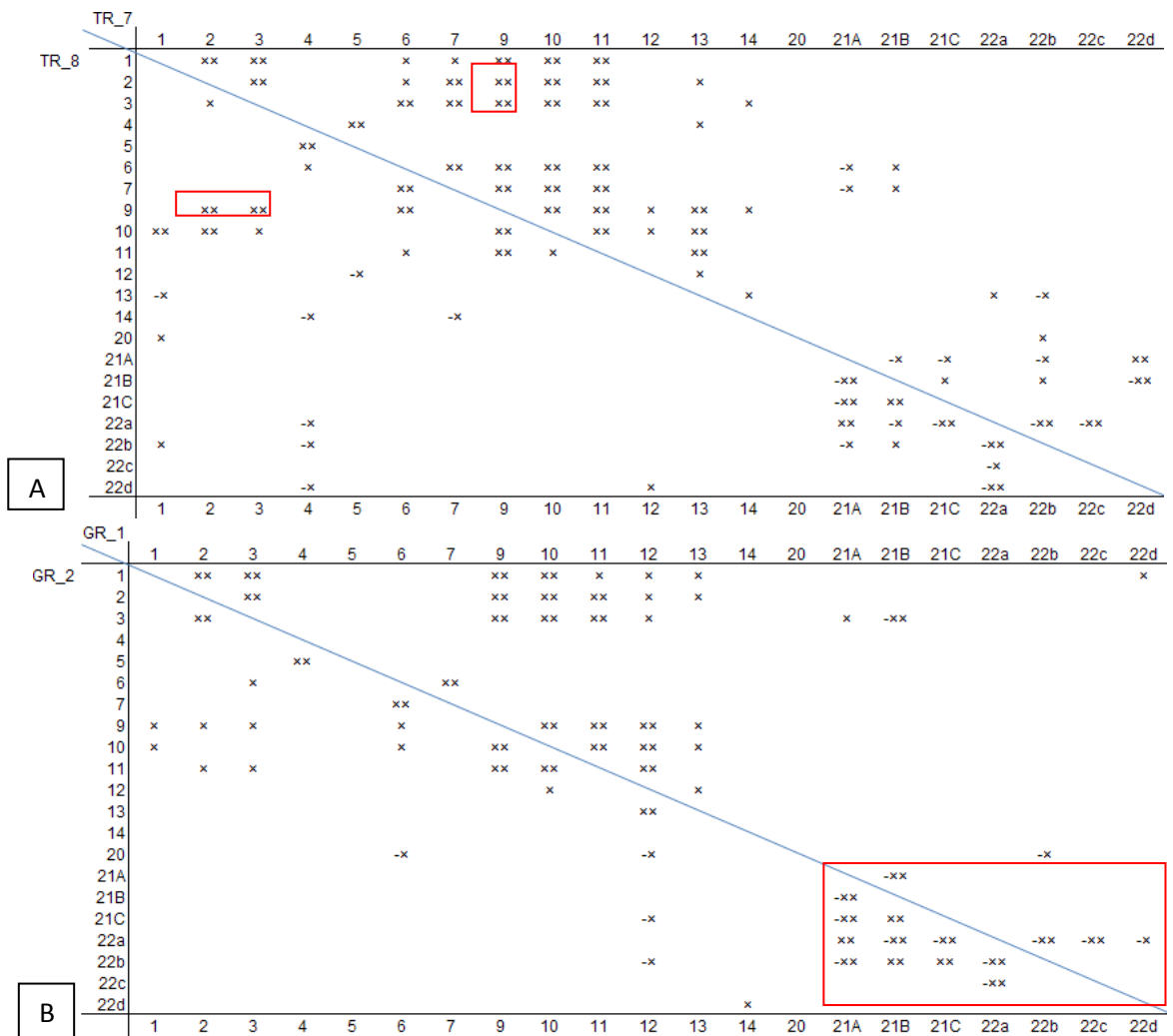
Większość z badanych 22 cech morfologicznych i anatomicznych igieł jest istotnie statystycznie skorelowana ze sobą (Ryc. 29).

1																						
2	xx																					
3	xx	xx																				
4	-x	xx	xx																			
5	-xx	xx	xx	xx																		
6	xx	xx	xx	xx	xx																	
7	xx	xx	xx	xx	xx	xx																
9	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx															
10	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx														
11	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx													
12	-x	-xx	-xx	-xx	-xx	-xx			xx	-xx												
13	-xx	xx				-xx		xx	xx	-x	xx											
14	x				-xx	-xx		xx	xx	-x	xx	xx										
20		xx	xx	xx	xx	xx		xx	xx	-xx	-xx	-xx	-xx									
21A	-xx		xx	x	xx		-xx	-xx	xx	-xx	-xx	-xx	-xx	xx								
21B	xx		-xx		-xx		xx	xx	-xx	xx	xx	xx	-xx	-xx								
21C	xx			-xx	-xx		xx	xx	-xx	xx	xx	xx	-xx	-xx	xx							
22a				xx	xx	xx			xx	-xx	-xx	-xx	xx	xx	-xx	-xx						
22b	-x	x	xx	xx	xx	x			xx	-x		-xx	xx	xx							-xx	-xx
22c	xx			-xx	-xx	-xx		xx	xx	-xx	xx	xx	xx	-xx	-xx	xx	xx	xx	xx	-xx	-xx	-xx
22d	-x	-xx	-xx	-xx	-xx	-xx	-xx	-xx	-xx	-xx	xx	xx	xx	-xx	-xx	xx	xx	xx	xx	-xx	-xx	xx
	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	20	21A	21B	21C	22a	22b	22c	22d	

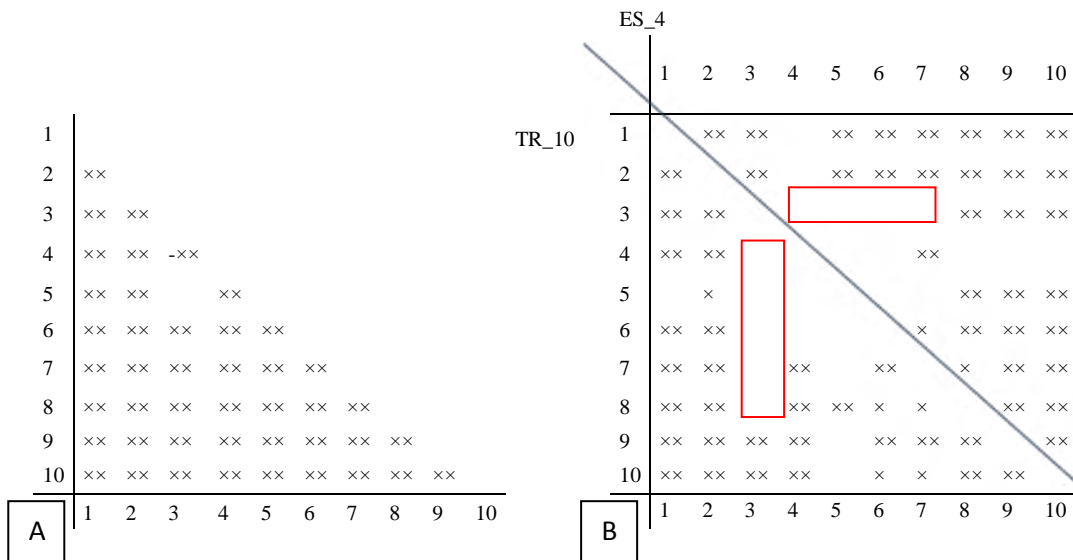
Rycina 29. Korelacje między cechami igieł 32 populacji *Pinus sylvestris* (numeracja cech wg Tab. 3); × - $p < 0,05$, xx - $p < 0,01$

We wszystkich badanych populacjach istotnie statystycznie skorelowane są szerokość przekroju igły (cecha 9) z liczbą rzędów aparatów szparkowych po wypukłej i płaskiej stronie igły (cechy 2 i 3) (Ryc. 30A). W większości populacji istotnie statystycznie ($p < 0,01$) skorelowane są cechy związane z typem komórek sklerenchymatycznych wokół kanałów (cecha 21) i między wiązkami przewodzącymi (cecha 22). Są to najczęściej korelacje ujemne (Ryc. 30B).

Z badanych 10 cech morfologicznych szyszek brak istotnych statystycznie korelacji jedynie pomiędzy liczbą łusek (cecha 3) i ich grubością (cecha 5) (Ryc. 31A). Podobnie wyglądają korelacje pomiędzy badanymi cechami w poszczególnych populacjach. Liczba łusek jest cechą nieskorelowaną z długością tarczki (cecha 4), szerokością tarczki (cecha 5), grubością tarczki (cecha 6) i odległością od umbo do szczytu tarczki (cecha 7) (Ryc. 31B).



Rycina 30. Korelacje między cechami igieł *Pinus sylvestris*: A. szerokością przekroju a liczbą rzędów aparatów szparkowych (cechy: 9, 2 i 3), B. typami komórek sklerenchymatycznych (cechy 21 i 22); × - $p < 0,05$, xx - $p < 0,01$; numeracja cech wg Tab. 3. Akronimy populacji jak w Tab. 1;



Rycina 31. Korelacje między cechami szyszek: A. 21 populacji *Pinus sylvestris*, B. wybranych populacji ze wskazaniem na liczbę tarczki (cecha 3); × - $p < 0,05$, xx - $p < 0,01$; numeracja cech wg Tab. 4. Akronimy populacji jak w Tab. 1

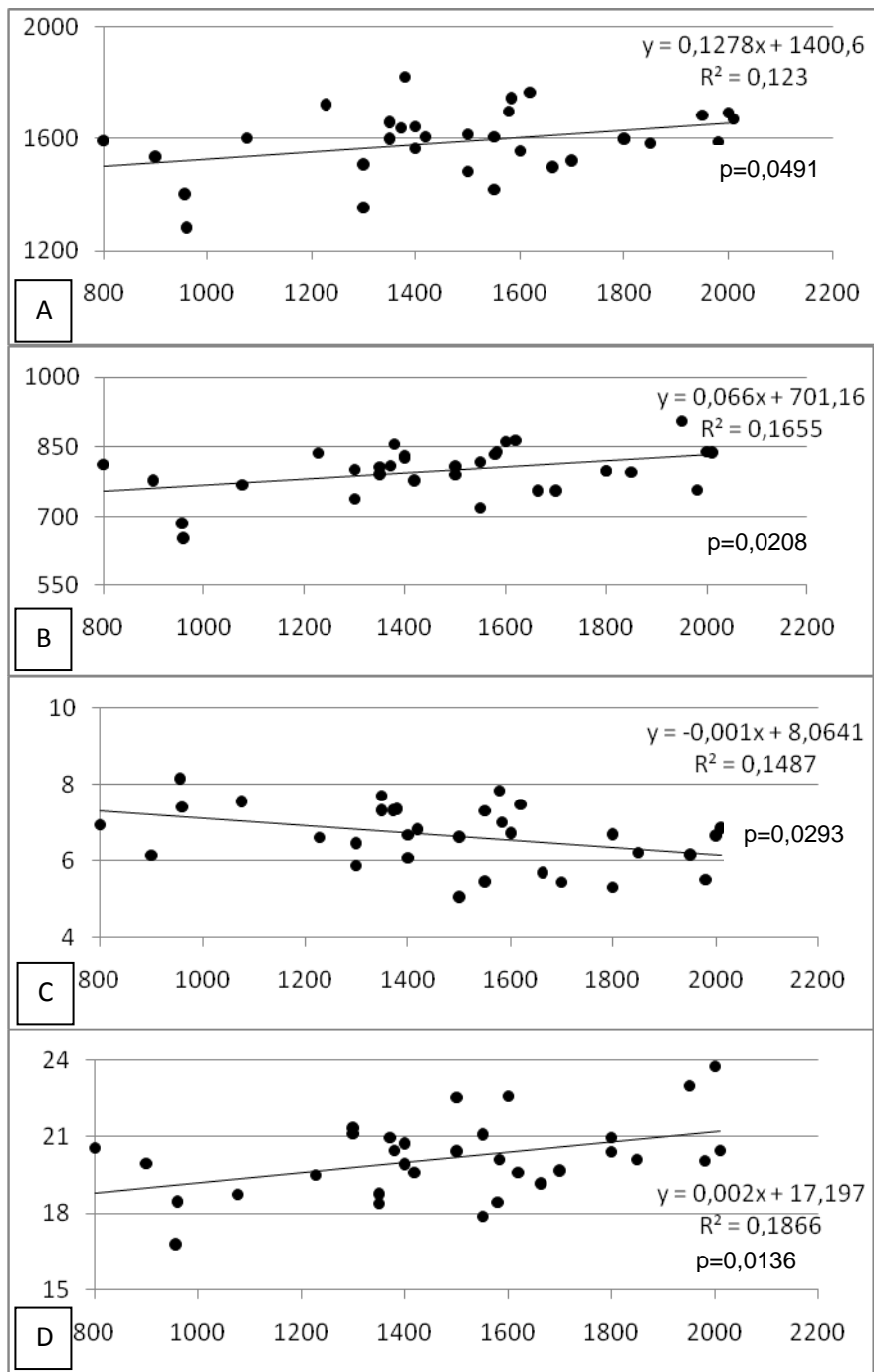
4.3. Zależność cech od wysokości nad poziomem morza i położenia geograficznego

Spośród cech prostych igieł istotną statystycznie zależność od wysokości nad poziomem morza wykazują szerokość igły (cecha 9, $p=0,0491$), wysokość igły (cecha 10, $p=0,0208$) oraz liczba kanałów po stronie wypukłej igły (cecha 6, $p=0,0293$) i wysokość komórki epidermy (cecha 13, $p=0,0136$). Jednak współczynnik determinacji we wszystkich przypadkach jest bardzo niski ($R^2 < 0,5$). Oznacza to, że jedynie niewielka część zmienności cech została wyjaśniona przez model. Można jednak zauważyć pewną tendencję, że wraz ze wzrostem wysokości n.p.m. igły stają się szersze, grubsze i pokryte są grubszą warstwą epidermy a liczba kanałów żywicznych zmniejsza się (Ryc. 32).

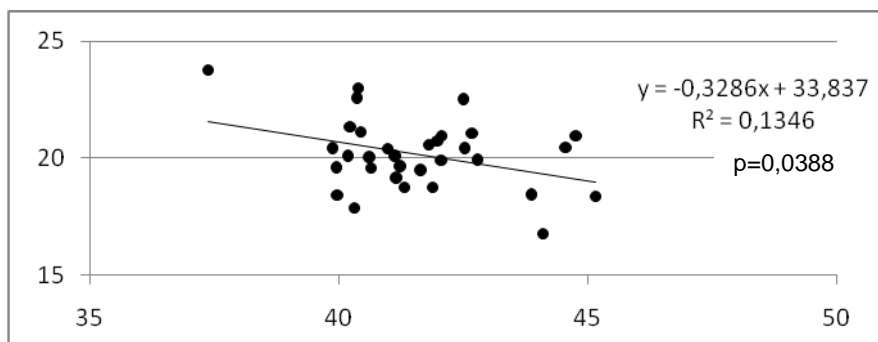
Istotną statystycznie zależność od szerokości geograficznej wykazała jedynie wysokość komórki epidermy (cecha 13, $p=0,0388$). Zależność ta wyjaśnia ok. 13% zmienności tej cechy ($R^2=0,1346$) (Ryc. 33).

Cechy szyszek także wykazują niewielką zależność od wysokości n.p.m. Statystycznie istotny jest wzrost maksymalnej średnicy szyszki (cecha 2, $p=0,007$) oraz grubości tarczki (cecha 6, $p=0,0157$) wraz ze wzrostem wysokości n.p.m. Zależność ta wyjaśnia ponad 30% zmienności tych cech (odpowiednio $R^2=0,32$ i $R^2=0,37$) (Ryc. 34). Zweryfikowałam również zależność wszystkich cech szyszek od szerokości i długości geograficznej. Wykazałam jedynie pewną tendencję, choć statystycznie istotną, zmniejszania się grubości tarczki (cecha 6, $p=0,0463$) wraz z przesuwaniami się na północ; zależność ta wyjaśnia jedynie 19% zmienności tej cechy ($R^2=0,19$) (Ryc. 35).

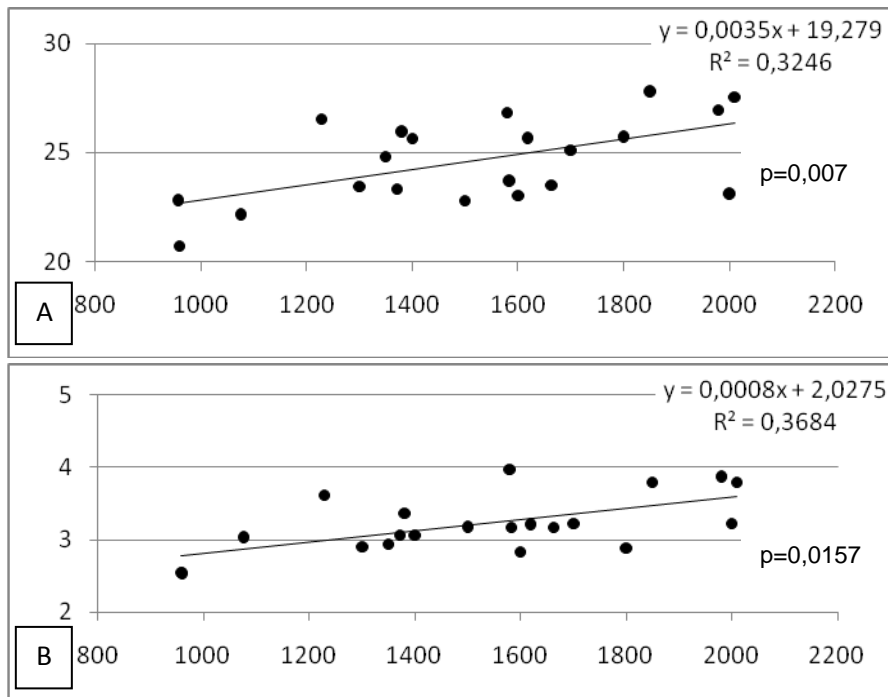
Duży rozrzut prób i podział na trzy odrębne grupy na wykresach zależności cech igieł i szyszek od długości geograficznej nie pozwoliły na wyznaczenie regresji liniowej.



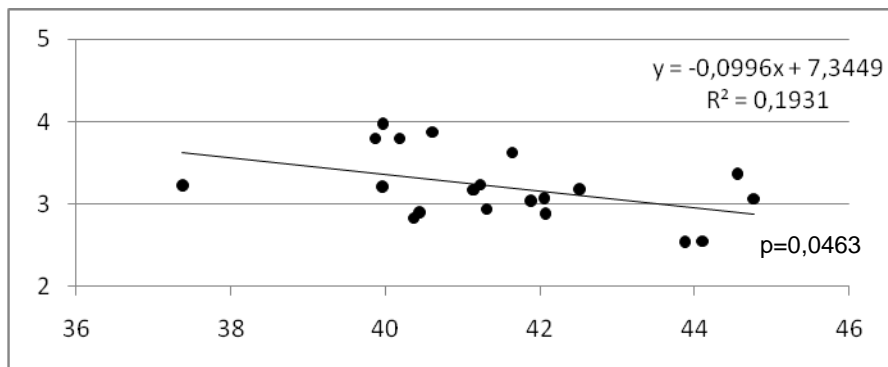
Rycina 32. Zależność cech igieł od wysokości n.p.m.: A. szerokość igły na przekroju (cecha 9), B. wysokość igły na przekroju (cecha 10), C. liczba kanałów po stronie wypukłej igły (cecha 6), D. wysokość komórki epidermy (cecha 13)



Rycina 33. Zależność wysokości komórki epidermy (cecha 13) od szerokości geograficznej



Rycina 34. Zależność cech szyszek od wysokości n.p.m.: A. maksymalna średnica szyszki (cecha 2), B. grubość tarczki (cecha 6)



Rycina 35. Zależność grubości tarczki (cecha 6) od szerokości geograficznej

4.4. Relacje pomiędzy populacjami *Pinus sylvestris*

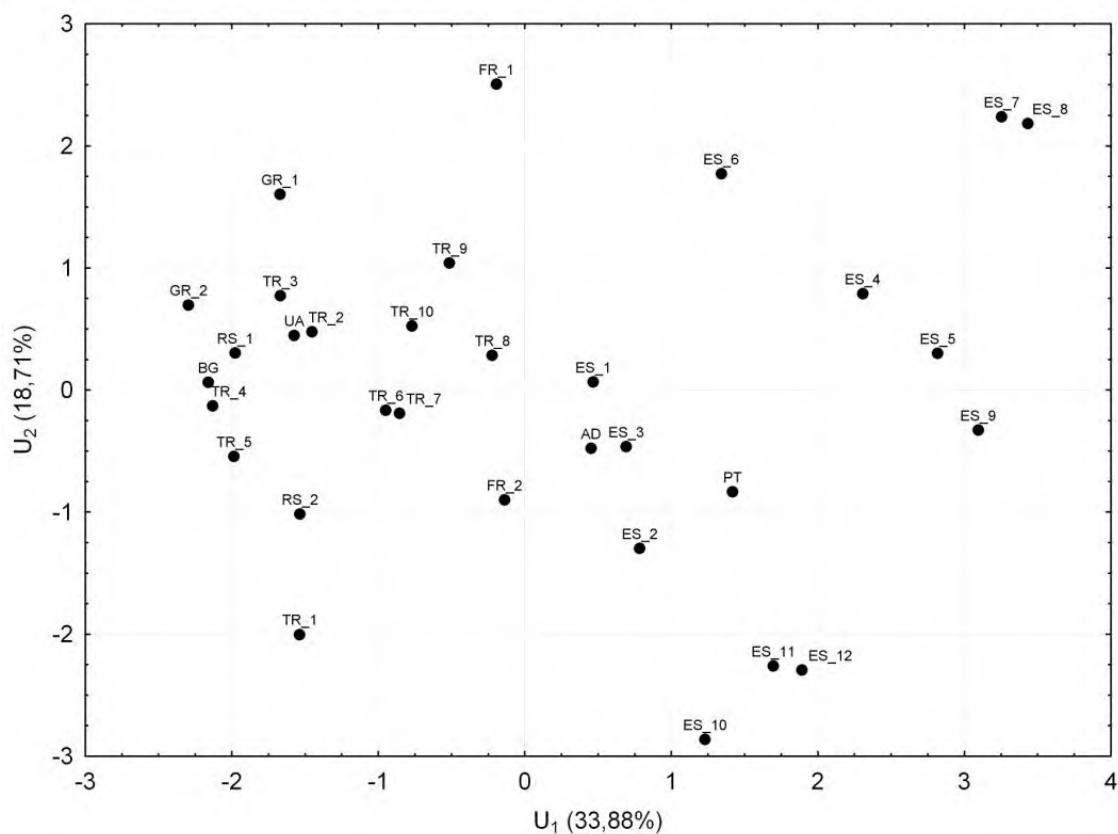
W celu określenia różnic pomiędzy badanymi populacjami przeprowadziłam test istotnej rozsądnej różnicy (RIR) Tukeya. Test dowodzi, że istnieją statystycznie istotne różnice w średnich wartościach cech pomiędzy większością populacji. Populacje są istotnie statystycznie zróżnicowane maksymalnie przez 15 cech. Różnice tej rangi zaobserwowałam pomiędzy populacjami z Ukrainy (UA) i Turcji (TR_9) (Tab. 11). W ramach regionów populacje różnicuje bardzo mała liczba cech (od 0 do 5) co szczególnie widoczne jest w populacjach Półwyspu Iberyjskiego i Bałkańskiego (Tab. 11A i B). Natomiast liczba cech różniących istotnie statystycznie populacje ze wschodniej części Turcji (TR_6-10) od populacji zachodniotureckich (TR_1-5) i ukraińskiej (UA) jest wysoka (przeciętnie 8,1) (Tab. 11C). Niska jest natomiast liczba cech różnicujących statystycznie istotnie populacje wschodniotureckie i te pochodzące z Półwyspu Iberyjskiego (Tab. 11D).

Analizę dyskryminacyjną na podstawie cech igieł przeprowadziłam na średnich z osobników dla 32 prób sosny zwyczajnej z wykorzystaniem pięciu cech syntetycznych (cechy 15-19) oraz siedmiu cech prostych (cechy: 1, 6, 7, 14 i 20-22), których nie uwzględniłam w cechach przeliczeniowych (Tab. 12). Wszystkie analizowane cechy miały istotny statystycznie wpływ ($p \leq 0,01$) na dyskryminację grup. Najsilniej dyskryminującymi cechami okazały się długość igły (cecha 1) z wartością cząstkowej λ Wilksa 0,52 oraz liczba kanałów żywicznych po stronie wypukłej igły (cecha 6), wskaźnik Marceta (cecha 15) i kształt komórki epidermy (cecha 19) z wartościami cząstkowej λ Wilksa odpowiednio: 0,72; 0,76 i 0,76 (Tab. 13).

Na płaszczyźnie pomiędzy dwoma pierwszymi zmiennymi dyskryminacyjnymi, zawarte jest 52,59% całkowitej informacji o zmienności. Centroidy prób rozdzieliły się względem pierwszej zmiennej (U_1), odpowiedzialnej za prawie 34% zmienności, na dwie niezbyt wyraźne grupy. Za ten podział odpowiadają przede wszystkim liczba warstw komórek sklerenchymatycznych nad floemem (cecha 20) oraz typ komórek wokół kanałów żywicznych (cecha 21a-c) (Tab. 12). Na wykresie rozrzutu populacje z Anatolii, Półwyspu Bałkańskiego i Krymskiego oddzielają się wyraźnie od populacji z Półwyspu Iberyjskiego. Pomiedzy nimi znalazły się populacje z Masywu Centralnego (FR_1 i FR_2). Druga zmienna (U_2), odpowiedzialna za 18,71% zmienności, nie rozdziela populacji na grupy a kształtuje ją przede wszystkim długość igły (cecha 1) (Tab. 12, Ryc. 36).

Analiza skupień wykonana na tym samym zestawie cech (cechy: 1, 6, 7, 14 i 20-22) (patrz Tab. 12) potwierdza wynik analizy dyskryminacji, przy czym znacznie wyraźniej zaznacza podział na dwie grupy. Można je określić jako grupę populacji zachodnich (Półwysep Iberyjski i Masyw Centralny) oraz wschodnich (Półwysep Bałkański, Półwysep Krymski i Anatolia). Dendrogram ukazuje również duże zróżnicowanie wewnętrzne grupy zachodniej, w której możemy dodatkowo wyróżnić dwie podgrupy. W pierwszej z nich znajdują się próby z zachodniej części Hiszpanii (ES_4, ES_5, ES_7, ES_8, ES_9), w drugiej – pozostałe populacje z Półwyspu Iberyjskiego i próby z Francji. W grupie wschodniej wyraźnie wydzielają się populacje z Półwyspu Bałkańskiego od populacji z Turcji i Krymu (Ryc. 37).

Podział ten widoczny jest również na dendrycie skonstruowanym na podstawie najkrótszych odległości Mahalanobisa (Ryc. 38).



Rycina 36. Analiza dyskryminacyjna wykonana na średnich wartościach cech igieł 32 prób *Pinus sylvestris*. Akronimy jak w Tab. 1

Tabela 11. Liczba cech igieł różnicujących istotnie statystycznie 32 populacje *P. sylvestris* na podstawie testu Tukeya; A- zróżnicowanie pop. iberyjskich, B- zróżnicowanie pop. bałkańskich, C- zróżnicowanie pop. z tureckich i krymskich, D- zróżnicowanie pop. wschodniej Anatolii a pop. iberyjskich. Akronimy jak w Tab. 1

PT	ES_9	ES_4	ES_12	ES_7	ES_8	ES_5	ES_10	ES_11	ES_2	ES_6	ES_3	ES_1	AD	FR_1	FR_2	RS_2	RS_1	GR_1	BG	GR_2	TR_3	TR_1	TR_4	UA	TR_5	TR_2	TR_6	TR_7	TR_8	TR_9	TR_10	D
	4	3	4	3	2	4	9	3	5	5	7	5	7	6	3	10	9	9	7	5	5	6	7	9	4	7	4	6	5	6	2	PT
		0	4	1	0	3	5	3	3	1	6	4	6	5	3	8	8	7	5	5	7	6	7	8	5	8	1	9	3	5	0	ES_9
			3	1	0	2	8	3	3	1	6	1	6	5	1	5	6	6	5	5	5	7	5	9	5	5	0	4	2	6	0	ES_4
				3	5	8	9	5	2	2	3	5	10	9	1	8	8	9	7	6	6	5	7	6	6	6	3	7	8	9	4	ES_12
					1	1	5	2	2	2	5	1	3	8	7	7	10	7	7	8	11	7	7	12	6	9	2	3	2	2	2	ES_7
						0	4	1	4	1	4	1	1	6	5	5	4	2	6	4	10	7	7	10	6	9	3	2	0	2	0	ES_8
							7	4	5	3	4	0	3	9	9	7	9	9	8	9	10	10	9	12	6	9	4	2	2	1	3	ES_5
								2	4	7	5	9	3	13	10	5	10	7	9	10	10	8	8	11	9	11	8	6	9	7	8	ES_10
									0	3	3	3	2	9	5	5	9	7	7	9	8	6	7	10	6	12	3	2	3	5	3	ES_11
										4	1	5	5	8	5	7	9	7	6	8	10	8	8	11	6	10	6	7	7	7	4	ES_2
											5	4	5	6	5	8	6	6	8	6	10	9	8	10	6	8	2	7	4	5	2	ES_6
												3	4	11	7	6	11	7	9	13	11	10	8	12	9	14	6	4	7	8	7	ES_3
													1	8	6	8	10	6	6	11	12	9	9	14	7	12	6	2	2	2	2	ES_1
														12	9	7	10	7	9	13	13	12	12	13	12	14	6	3	4	4	5	AD
															4	11	4	5	3	5	8	3	5	10	4	5	6	5	8	6	8	FR_1
																9	6	8	4	3	2	0	2	5	0	3	0	4	8	4	6	FR_2
																	3	2	5	7	11	8	7	12	6	11	6	8	6	7	7	RS_2
																		1	4	4	11	9	9	9	8	7	8	8	4	7	6	RS_1
																			4	6	10	8	10	13	7	9	8	6	3	5	6	GR_1
																				3	5	2	4	8	3	3	6	3	5	8	5	BG
																					1	1	1	5	0	1	3	4	6	8	3	GR_2
																						5	2	3	0	0	4	10	12	11	7	TR_3
																							2	5	1	3	5	6	9	8	3	TR_1
																								1	0	2	2	8	8	9	4	TR_4
																								3	4	6	12	13	15	7	UA	
																									3	2	4	4	9	3	TR_5	
																										4	9	9	10	6	TR_2	
																											5	5	7	0	TR_6	
																												1	2	1	TR_7	
																												0	1	TR_8		
																													0	TR_9		

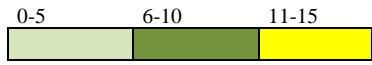
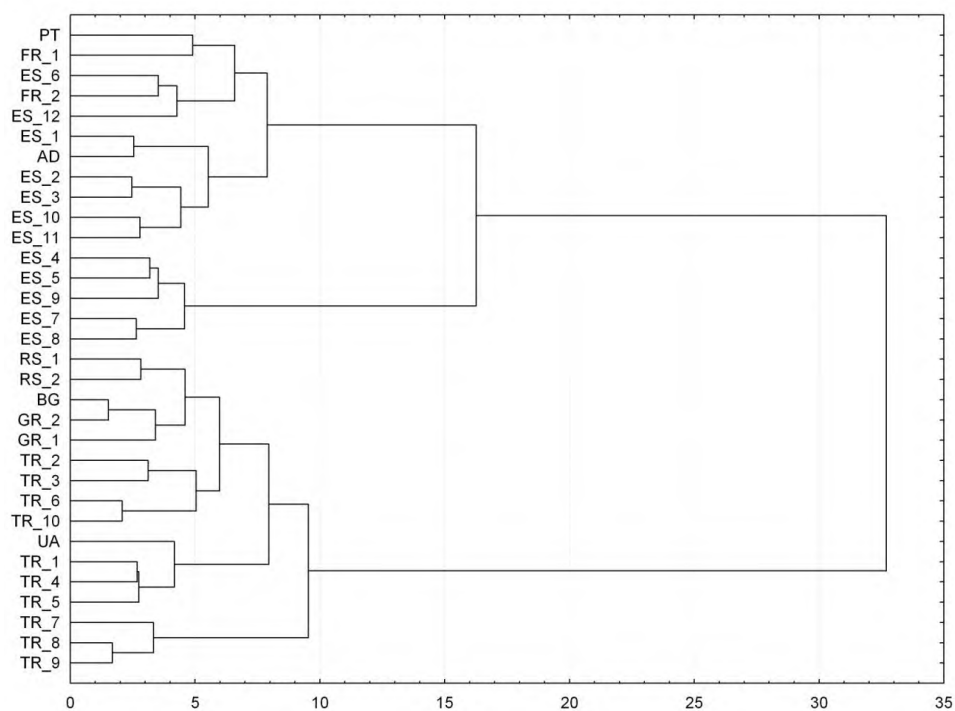


Tabela 12. Współczynniki standaryzowane zmiennych kanonicznych – analiza funkcji dyskryminacji dla cech igieł 32 populacji *Pinus sylvestris*

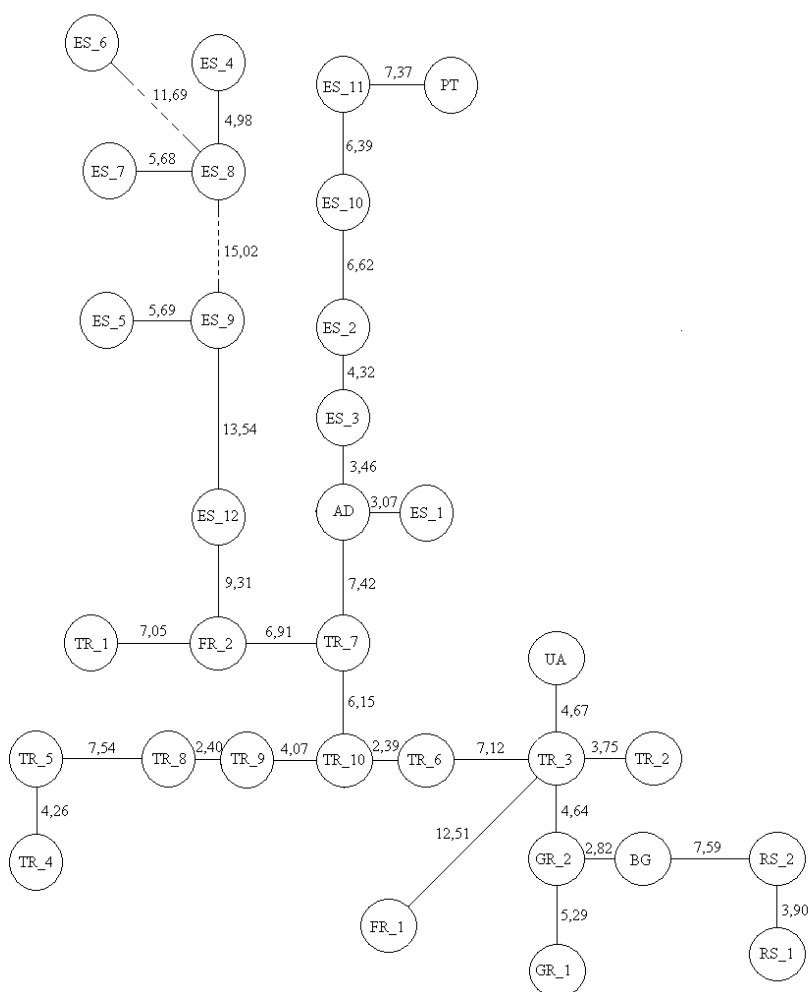
Nr	Cecha	U ₁ (33,88%)	U ₂ (18,71%)
1	Długość igły	0,00	9,19
6	Liczba kanałów żywicznych po stronie wypukłej igły	1,46	0,06
7	Liczba kanałów żywicznych po stronie płaskiej igły	0,00	0,00
14	Średnia wysokość komórki hypodermy	1,38	0,07
15	Wskaźnik Marceta	4,47	0,41
16	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły/liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły	0,37	0,05
17	Średnia liczba szparek po wypukłej/średnia liczba szparek po płaskiej	0,56	0,05
18	Wysokość igły/szerokość igły	1,21	0,36
19	Średnia szerokość komórki epidermy/średnia wysokość komórki epidermy	0,57	0,92
20	Liczba warstw komórek sklerenchymatycznych nad floemem	11,99	0,64
	<u>Typ komórek wokół kanałów żywicznych</u>		
21A	Komórki grubościennie z małym światłem komórkowym	13,73	0,05
21B	Typ komórek pośrednich	13,12	0,06
21C	Komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym	7,01	1,07
	<u>Typ komórek między wiązkami przewodzącymi</u>		
22a	Komórki grubościennie z małym światłem komórkowym	6,68	0,02
22b	Komórki grubościennie o pośredniej wielkości światła komórkowego	0,85	1,12
22c	Komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym, na przekroju owalne lub okrągłe	4,86	1,59
22d	Komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym o nieregularnych kształtach	6,68	1,16

Tabela 13. Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacji cech igieł 32 populacji *Pinus sylvestris*

Nr	Cecha	Lambda Wilksa	Cząstkowa L. Wilksa	Wartość F	Poziom p	Tolerancja	1-Toler. (R ²)
1	Długość igły	0,007	0,521	26,759	0,000	0,894	0,106
6	Liczba kanałów żywicznych po stronie wypukłej igły	0,005	0,718	11,451	0,000	0,513	0,487
7	Liczba kanałów żywicznych po stronie płaskiej igły	0,004	0,827	6,101	0,000	0,511	0,489
14	Średnia wysokość komórki hypodermy	0,004	0,843	5,403	0,000	0,972	0,028
15	Wskaźnik Marceta	0,004	0,758	9,276	0,000	0,581	0,419
16	Liczba rzędów po wypukłej/Liczba rzędów aparatów szparkowych po płaskiej stronie igły	0,004	0,883	3,857	0,000	0,934	0,066
17	Średnia liczba szparek po wypukłej/średnia liczba szparek po płaskiej	0,004	0,880	3,983	0,000	0,974	0,026
18	Wysokość igły/Szerokość igły	0,004	0,858	4,805	0,000	0,681	0,319
19	Średnia szerokość/Średnia wysokość komórki epidermy	0,005	0,755	9,466	0,000	0,966	0,034
20	Liczba warstw komórek sklerenchymatycznych nad floemem	0,004	0,779	8,268	0,000	0,824	0,176
	<u>Typ komórek wokół kanałów żywicznych</u>						
21A	Komórki grubościennie z małym światłem komórkowym	0,004	0,930	2,185	0,000	0,016	0,984
21B	Typ komórek pośrednich	0,004	0,938	1,923	0,002	0,031	0,969
21C	Komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym	0,004	0,879	4,005	0,000	0,080	0,920
	<u>Typ komórek między wiązkami przewodzącymi</u>						
22a	Komórki grubościennie z małym światłem komórkowym	0,004	0,841	5,513	0,000	0,089	0,911
22b	Komórki grubościennie o pośredniej wielkości światła komórkowego	0,004	0,823	6,258	0,000	0,189	0,811
22c	Komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym, na przekroju owalne lub okrągłe	0,004	0,880	3,949	0,000	0,190	0,810
22d	Komórki cienkościennie z dużym światłem komórkowym o nieregularnych kształtach	0,004	0,768	8,797	0,000	0,241	0,759



Rycina 37. Dendrogram wykonany metodą Warda, na podstawie najkrótszych odległości euklidesowych, na średnich wartościach cech igieł 32 prób *Pinus sylvestris*. Akronimy jak w Tab. 1



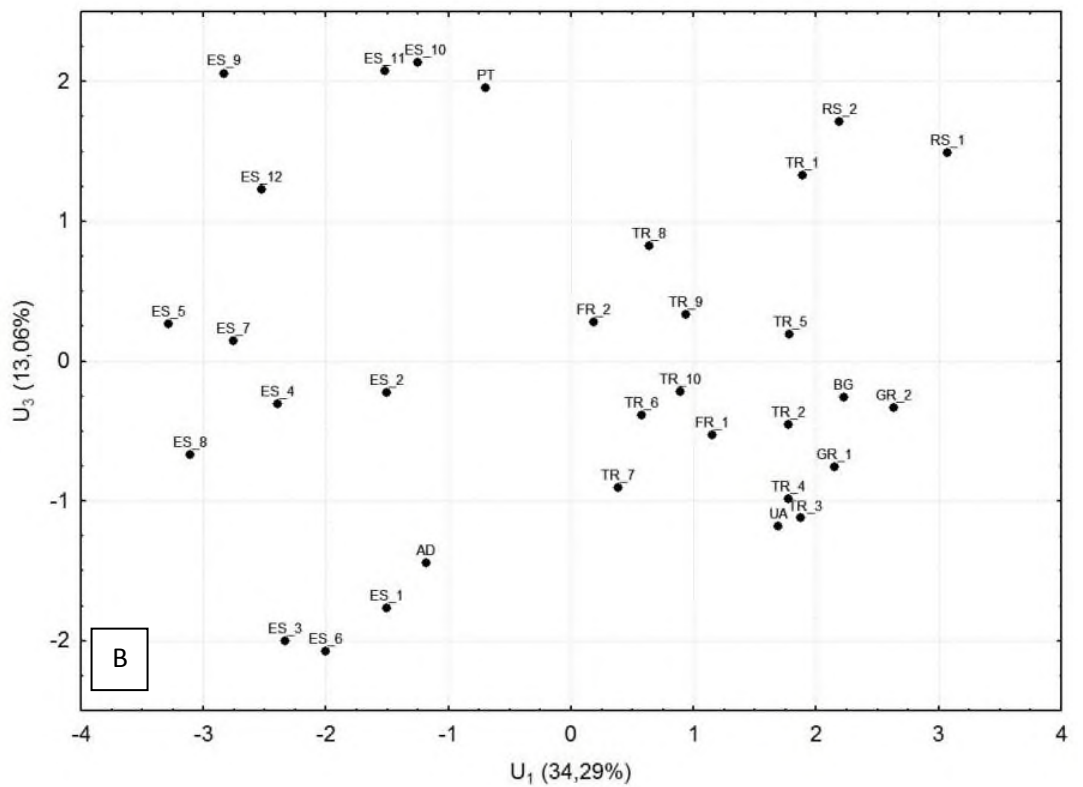
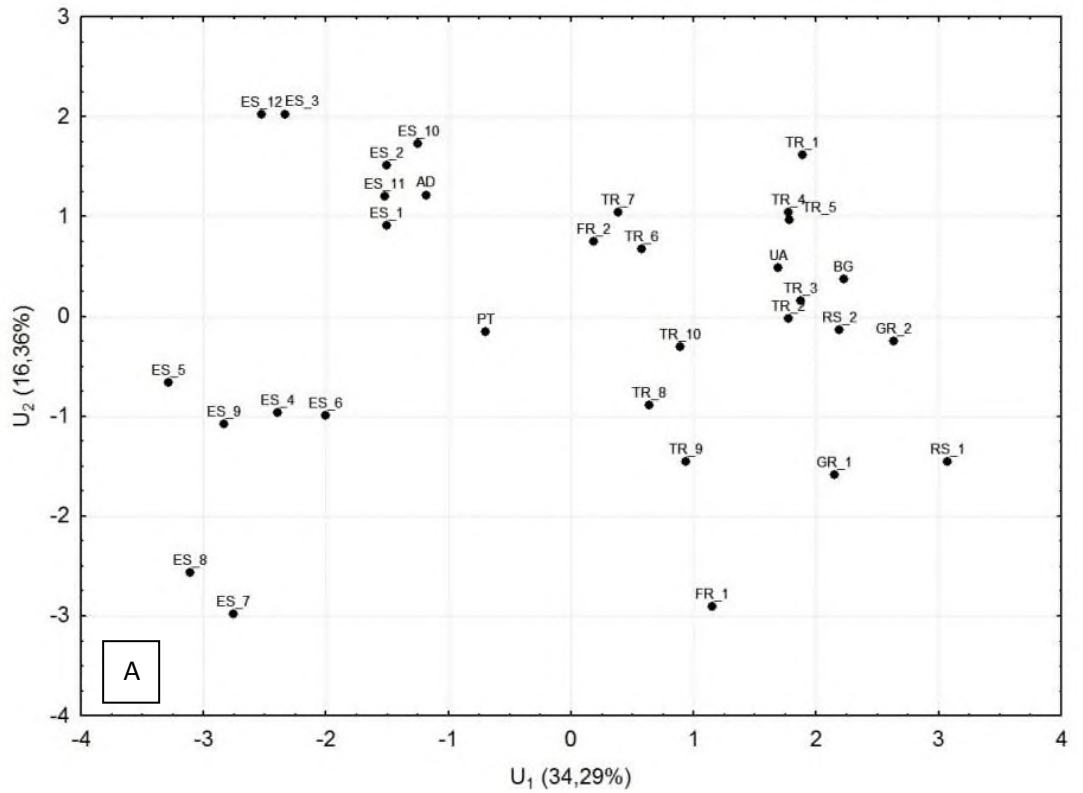
Rycina 38. Minimalne drzewo rozpinające populacji *P. sylvestris* skonstruowane na podstawie najkrótszych odległości Mahalanobisa w oparciu o biometrię igieł. Akronimy jak w Tab. 1.

Dla lepszego zrozumienia zróżnicowania i rozkładu populacji na płaszczyźnie pomiędzy zmiennymi wykonałam dodatkową analizę dyskryminacji jedynie dla cech prostych (cechy: 1-5 i 8-14). Pierwszy wykres przedstawiający płaszczyznę pomiędzy zmiennymi U_1 i U_2 zawiera ponad 50% informacji o zmienności pomiędzy populacjami. Widoczne jest na nim rozdzielenie populacji na dwie grupy pod względem pierwszej zmiennej (U_1) odpowiedzialnej za 34,29% zmienności. Cechami, które wpływają na taki rozkład są przede wszystkim: odległość między wiązkami przewodzącymi (cecha 11), średnia wysokość komórki epidermy (cecha 13) oraz cechy związane z występowaniem i typem komórek sklerenchymatycznych nad wiązką przewodzącą (cecha 20), wokół kanałów żywicznych (cecha 21 a-c) i między wiązkami przewodzącymi (cecha 22 A-D) (Tab. 14). Pod względem pierwszej zmiennej (U_1) obserwujemy także niewielkie oddalenie się prób pochodzących ze wschodniej części Anatolii (TR_7-10) od reszty populacji tureckich (TR_1-6) i bałkańskich (GR_1 i 2, BG, RS_1 i 2). Druga zmienna (U_2), odpowiedzialna za niewiele ponad 16% zmienności różnicuje populacje pochodzące z Półwyspu Iberyjskiego. Za taki układ odpowiedzialna jest przede wszystkim długość igieł (cecha 1) (Ryc. 39A).

Kolejny wykres funkcji dyskryminacji przedstawia płaszczyznę pomiędzy zmiennymi U_1 i U_3 . Układ na płaszczyźnie U_1 jest niemal identyczny z wcześniej opisanym; podobnie w przypadku U_3 (odpowiada za 13% zmienności) jednak mają na niego wpływ przede wszystkim szerokość igły (cecha 9) i udział poszczególnych typów komórek sklerenchymatycznych (cecha 21b, 22A i D) (Ryc. 39B). Populacje Półwyspu Iberyjskiego są inaczej pogrupowane a portugalska populacja (PT) wykazuje mniej pośredni charakter. Na obu wykresach (Ryc. 39A i B) populacje z Masywu Centralnego (FR_1 i FR_2) zbliżone są do populacji z grupy turecko-bałkańskiej.

Tabela 14. Współczynniki standaryzowane zmiennych kanonicznych – analiza funkcji dyskryminacji dla cech prostych igieł 32 populacji *Pinus sylvestris*

Nr	Cechy	U ₁ (34,29%)	U ₂ (16,37%)	U ₃ (13,07%)
1	Długość igły	0,20	7,43	0,29
2	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły	0,28	0,04	0,26
3	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły	0,84	0,00	0,16
4	Średnia liczba aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły	0,72	0,33	0,12
5	Średnia liczba aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły	1,71	0,65	0,12
6	Liczba kanałów żywicznych po stronie wypukłej igły	1,63	0,09	0,06
7	Liczba kanałów żywicznych po stronie płaskiej igły	0,00	0,00	0,00
9	Szerokość igły na przekroju poprzecznym	0,00	0,32	1,35
10	Wysokość igły na przekroju poprzecznym	0,59	0,55	1,05
11	Odległość między wiązkami przewodzącymi	3,06	0,07	1,05
12	Średnia szerokość komórki epidermy	1,32	0,01	0,05
13	Średnia wysokość komórki epidermy	3,46	1,57	0,11
14	Średnia wysokość komórki hypodermy	1,22	0,05	0,00
20	Liczba warstw komórek sklerenchymatycznych nad floemem	9,01	1,18	0,03
	<u>Typ komórek wokół kanałów żywicznych</u>			
21 a	Komórki cienkościenne z dużym światłem komórkowym	8,41	1,25	1,00
21 b	Typ komórek pośrednich	8,07	0,61	1,50
21 c	Komórki grubościenne z małym światłem komórkowym	4,30	1,91	0,04
	<u>Typ komórek między wiązkami przewodzącymi</u>			
22 A	Komórki cienkościenne z dużym światłem komórkowym o nieregularnych kształtach	4,08	0,55	1,26
22 B	Komórki cienkościenne z dużym światłem komórkowym, na przekroju owalne lub okrągłe	0,64	0,55	0,46
22 C	Komórki grubościenne o pośredniej wielkości światła komórkowego	3,76	1,01	0,72
22 D	Komórki grubościenne z małym światłem komórkowym	3,43	0,30	6,11



Rycina 39. Analiza dyskryminacyjna wykonana na średnich wartościach cech prostych igieł 32 prób *Pinus sylvestris* pomiędzy zmiennymi U_1 i U_2 (A) oraz U_1 i U_3 (B). Akronimy jak w Tab. 1

W celu wyłonienia cech szyszek różniących poszczególne populacje przeprowadziłam test istotnej rozsądnej różnicy (RIR) Tukeya. Statystycznie istotne różnice w średnich wartościach cech wykazałam pomiędzy większością populacji. Populacje są istotnie statystycznie zróżnicowane maksymalnie przez 13 cech. Różnice tej rangi zaobserwowałam pomiędzy populacjami z Sierra de Baza (ES_12) i Sierra de Neila (ES_4), Cuenci (ES_11) oraz jedną turecką (TR_5). Populacja z Andory (AD) różni się w 13 cechach szyszek od dwóch populacji tureckich (TR_5 i TR_6); podobnie jedna turecka populacja (TR_2) od hiszpańskiej (ES_6) (Tab. 15). W ramach regionów populacje różnicuje bardzo mała liczba cech (od 0 do 4) co szczególnie widoczne jest w populacjach Półwyspu Bałkańskiego (Tab. 15A). Przy czym liczba cech szyszek różnicujących istotnie statystycznie populacje wschodniotureckie (TR_6, TR_7, TR_8, TR_9 i TR_10) od populacji zachodniotureckich (TR_2, TR_3, TR_4 i TR_5) jest wysoka (przeciętnie 9) (Tab. 15B). Znaczna jest również liczba cech szyszek różnicujących statystycznie istotnie populacje z Turcji i Ukrainy oraz z Półwyspu Iberyjskiego, Masywu Centralnego i Półwyspu Bałkańskiego (Tab. 15C).

Tabela 15. Liczba cech szyszek różnicujących istotnie statystycznie 21 populacji *Pinus sylvestris*; na podstawie testu Tukeya; A- zróżnicowanie populacji Półwyspu Bałkańskiego, B- zróżnicowanie populacji Anatolii i Półwyspu Krymskiego, C- zróżnicowanie populacji z Półwyspu Iberyjskiego. Akronimy jak w Tab. 1

	ES_4	ES_12	ES_5	ES_11	ES_2	ES_6	FR_2	RS_2	RS_1	BG	GR_2	TR_3	TR_4	UA	TR_5	TR_2	TR_6	TR_7	TR_8	TR_9	TR_10	
		13	4	8	10	6	8	8	8	9	8	6	8	7	6	10	6	9	6	5	6	ES_4
			8	13	6	7	6	9	5	7	9	11	8	11	13	12	12	11	12	12	12	ES_12
				8	6	6	5	9	4	8	5	5	8	5	8	7	4	5	5	7	5	ES_5
					6	6	3	8	0	4	1	8	12	5	9	9	9	9	2	3	9	ES_11
						6	3	8	5	9	7	9	8	7	10	10	9	10	6	10	11	ES_2
							4	4	1	1	7	8	6	7	10	13	7	9	1	5	10	ES_6
								7	3	3	5	8	4	6	10	10	12	8	3	10	11	FR_2
									1	2	3	8	6	8	11	11	11	11	4	7	11	RS_2
										0	2	7	5	6	8	8	9	7	2	7	10	RS_1
											4	10	8	6	10	12	10	10	3	7	12	BG
												7	12	4	8	9	9	10	5	3	8	GR_2
													3	6	2	2	4	5	5	6	8	TR_3
														8	9	6	8	10	5	12	10	TR_4
															3	5	6	3	4	4	6	UA
																1	4	5	6	5	5	TR_5
																	1	2	5	8	7	TR_2
																		0	7	5	0	TR_6
																			7	8	4	TR_7
																				5	7	TR_8
																					6	TR_9
																						TR_10

0-4 5-9 10-13

C (Iberian Peninsula)

A (Balkan Peninsula)

B (Anatolia and Crimean Peninsula)

Analizę dyskryminacyjną na podstawie cech szyszek przeprowadziłam dla 21 prób sosny zwyczajnej z wykorzystaniem 8 cech syntetycznych (cechy 11-18) (Tab. 16). Wszystkie analizowane cechy miały wysoce istotny statystycznie ($p \leq 0,01$) wpływ na wydzielenie grup. Najsilniej dyskryminującymi cechami okazały się: stosunek maksymalnej średnicy szyszki do średnicy szyszki mierzonej w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki (cecha 18) z wartością cząstkowej λ Wilksa 0,76 oraz iloraz długość do szerokości tarczki (cecha 13) z wartością cząstkowej λ Wilksa 0,8 (Tab. 17).

Tabela 16. Współczynniki standaryzowane zmiennych kanonicznych – analiza funkcji dyskryminacji dla cech igieł 21 populacji *Pinus sylvestris*

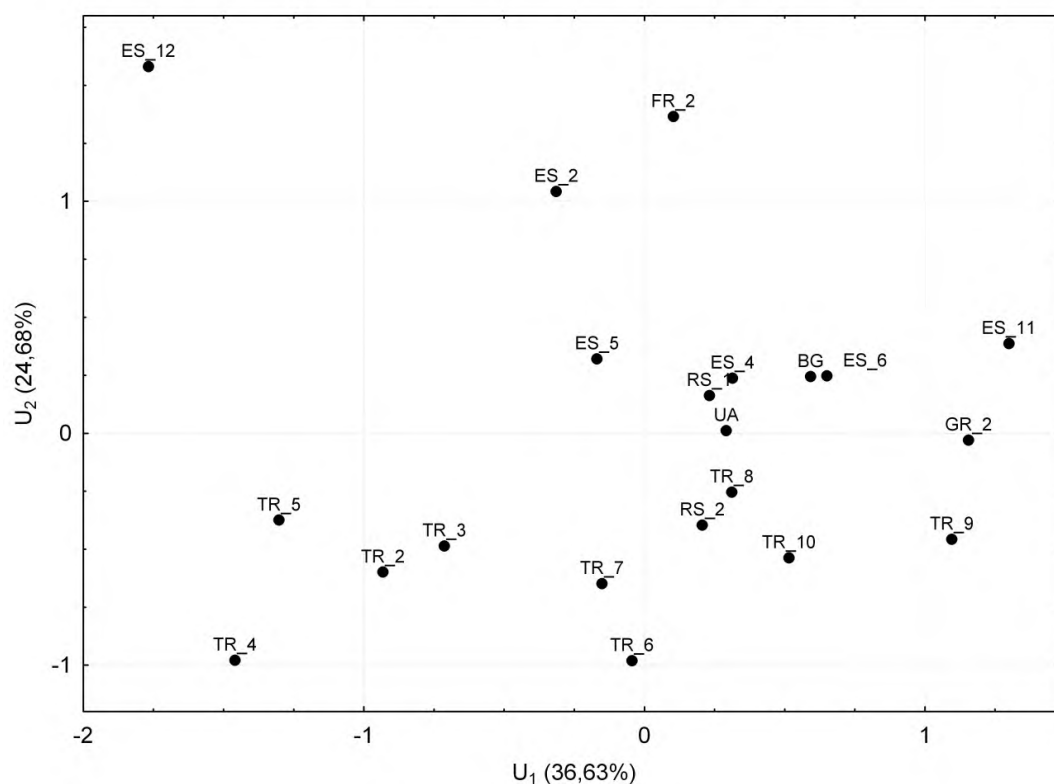
Nr	Cecha	U ₁ (36,63%)	U ₂ (24,58%)
11	Długość szyszki/Maksymalna średnica szyszki	2,88	0,94
12	Długość szyszki/Liczba łusek	0,12	7,58
13	Długość tarczki/Szerokość tarczki	13,88	3,98
14	Długość tarczki/Grubość tarczki	5,21	0,07
15	Asymetria szyszki	1,66	0,00
16	Szerokość szyszki/Liczba łusek	3,82	18,70
17	Odległość umbo od szczytu tarczki/Grubość tarczki	11,50	0,94
18	Maksymalna średnica szyszki/Średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki	7,53	0,00

Tabela 17. Podsumowanie analizy funkcji dyskryminacji cech szyszek 21 populacji *Pinus sylvestris*

Nr	Cecha	Lambda Wilksa	Cząstkowa L. Wilksa	Wartość F	Poziom p	Tolerancja	1-Toler. (R ²)
11	Długość szyszki/Maksymalna średnica szyszki	0,20	0,96	2,30	0,00	0,03	0,97
12	Długość szyszki/Liczba łusek	0,21	0,95	2,56	0,00	0,01	0,99
13	Długość tarczki/Szerokość tarczki	0,24	0,80	12,36	0,00	0,89	0,11
14	Długość tarczki/Grubość tarczki	0,23	0,84	9,42	0,00	0,40	0,60
15	Asymetria szyszki	0,21	0,92	4,29	0,00	0,96	0,04
16	Szerokość szyszki/Liczba łusek	0,21	0,94	2,94	0,00	0,02	0,98
17	Odległość umbo od szczytu tarczki/Grubość tarczki	0,23	0,83	9,89	0,00	0,41	0,59
18	Maksymalna średnica szyszki/Średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki	0,26	0,76	15,55	0,00	0,97	0,03

Na płaszczyźnie pomiędzy dwoma pierwszymi zmiennymi dyskryminacyjnymi, zawarte jest 61,31 % całkowitej informacji o zmienności w oparciu o dane biometryczne szyszek. Centroidy prób nie rozdzieliły się względem pierwszej zmiennej (U₁), odpowiedzialnej za prawie 37% zmienności, na wyraźne grupy. Obserwujemy jedynie rozproszenie prób, za które odpowiadają przede wszystkim cechy tarczki: iloraz długość do szerokości tarczki (cecha 13) oraz iloraz odległość umbo od szczytu tarczki do grubości tarczki (cecha 17) (Tab.16). Druga zmienna (U₂), odpowiedzialna za 24,68 % zmienności, widocznie oddziela trzy populacje: hiszpańską populację z Sierra de Baza (ES_12), populację z Sierra de Gudar (ES_2) oraz populację z Masywu Centralnego

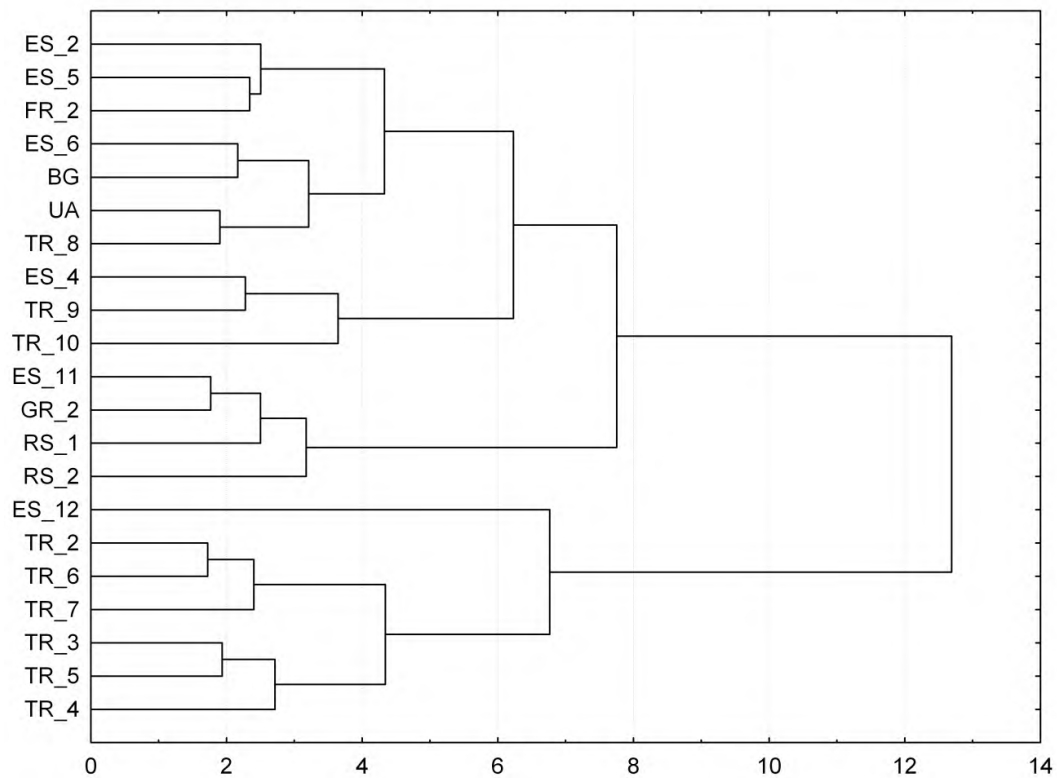
(FR_2). Związane jest to przede wszystkim z liczbą łusek przypadających na długość (cecha 12) i szerokość szyszki (cecha 16) (Tab. 16, Ryc. 40).



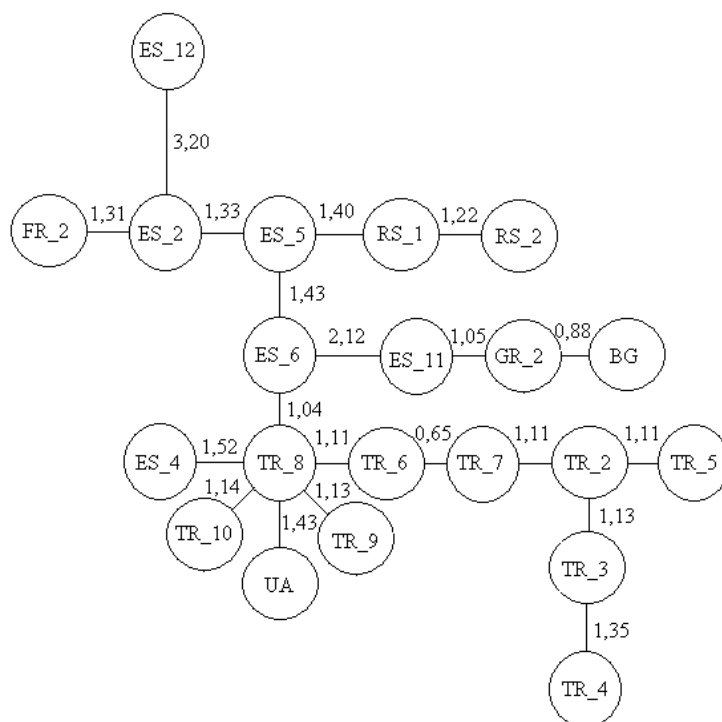
Rycina 40. Analiza dyskryminacyjna wykonana na średnich wartościach cech szyszek 21 prób *Pinus sylvestris*. Akronimy jak w Tab. 1

Analiza skupień wykonana na tym samym zestawie cech (cechy 11-18) (Tab. 16) uzupełnia wynik analizy dyskryminacji. Grupy wyodrębnione na dendrogramie częściowo odpowiadają układowi centroidów na wykresie dyskryminacji, nie mają jednak przełożenia na geograficzne położenie badanych populacji (Ryc. 40 i 41).

Podział na populacje wschodnie (Anatolia i Półwysep Krymski) oraz zachodnie (Półwysep Iberyjski, Masyw Centralny i Półwysep Bałkański) jest widoczny na wykresie drzewa rozpinającego skonstruowanego na podstawie najkrótszych odległości Mahalanobisa. Wyjątek stanowi populacja z Sierra de Neila (ES_4), która dołączyła do grupy populacji tureckich. Ponadto wykryto dużą odległość dzielącą próby z Półwyspu Bałkańskiego: serbskie (RS_2 i RS_1) od bułgarskiej (BG) i greckiej (GR_2). Na wykresie widoczny jest również duży dystans pomiędzy próbą z Sierra de Baza (ES_12) a pozostałymi populacjami z grupy „zachodniej” (Ryc. 42).



Rycina 41. Dendrogram wykonany metodą Warda, na podstawie najkrótszych odległości euklidesowych, na średnich wartościach cech szyszek 21 prób *Pinus sylvestris*. Akronimy jak w Tab. 1



Rycina 42. Minimalne drzewo rozpinające populacji *P. sylvestris* skonstruowane na podstawie najkrótszych odległości Mahalanobisa wyliczonych na podstawie cech szyszek. Akronimy jak w Tab. 1

4.5. Analizy genetyczne

Rozdziały elektroforetyczne 956 osobników pochodzących z 32 populacji wskazują na obecność mitotypów *a* i *b* na terenach refugialnych południowej Europy i południowo-zachodniej części Azji. Populacje hiszpańskie reprezentują mitotyp *b*. Wyjątkiem są populacje z Sierra de Baza (ES_12), gdzie dominuje mitotyp *a* oraz populacje ES_9 i ES_8, w których mitotyp ten występuje w około 50% osobników. Populacje z Portugalii (PT), Francji (FR_1) oraz populacje z Półwyspu Bałkańskiego, Krymskiego i Anatolii charakteryzują się mitotypem *a*. Jedynie populacja położona w Masywie Centralnym (FR_1) cechuje się niewielkim (ok. 3%) udziałem mitotypu *b*, a populacja z okolic Limni Golu w Turcji (TR_7) ok. 25% udziałem tego mitotypu (Ryc. 43).

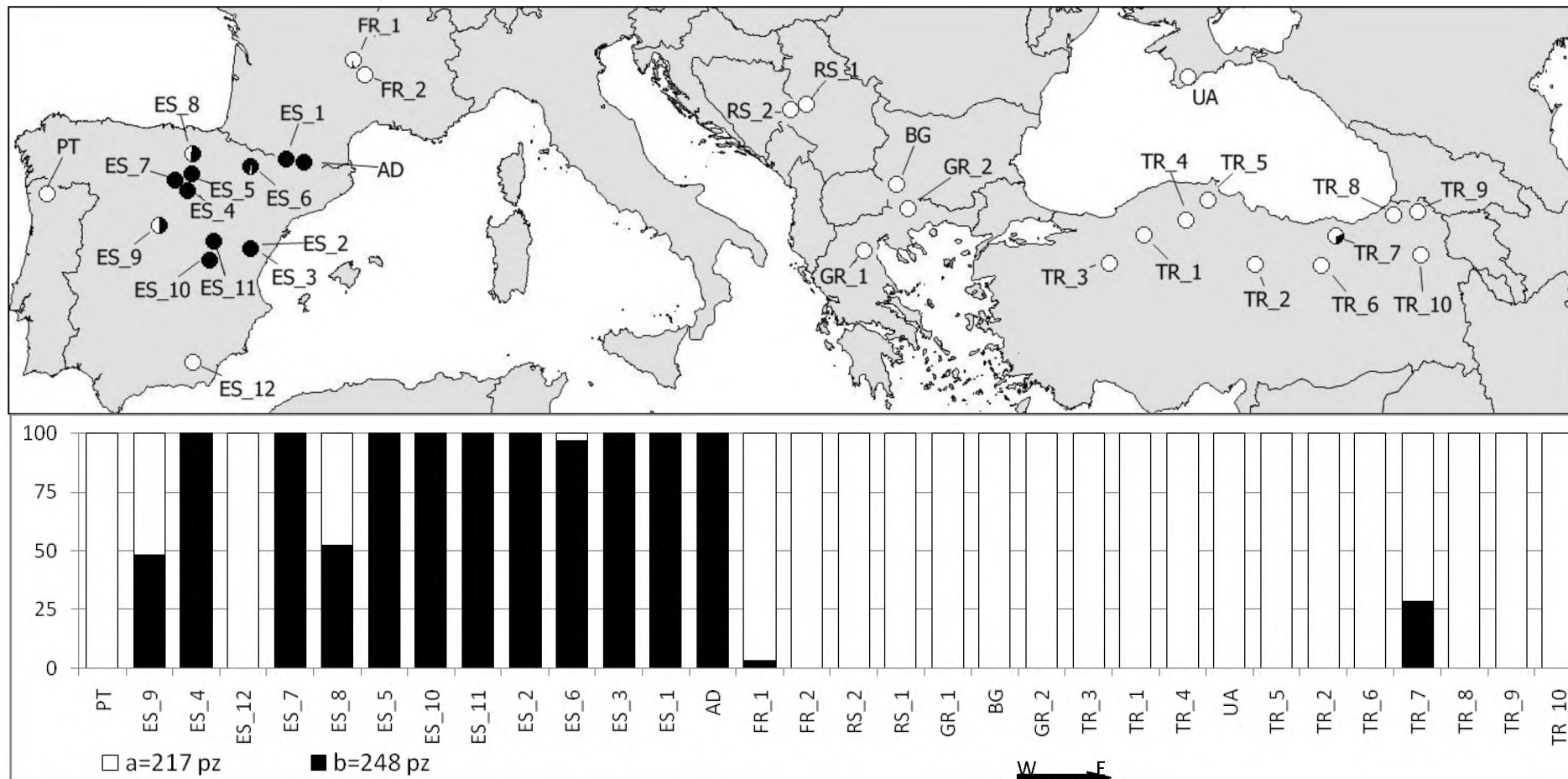
Wyznaczone Φ – statystyki wskazują na wysoki stopień zróżnicowania międzypopulacyjnego w locus *nad1* (91% przy $p \leq 0,01$), natomiast zróżnicowanie wewnątrz populacyjne jest niskie i stanowi 9% ($p \leq 0,01$) całkowitej zmienności genetycznej. Analiza wariancji (AMOVA) pozwoliła ustalić, że 69% ($p \leq 0,01$) całkowitej genetycznej zmienności może być wyjaśnione różnicami pomiędzy regionami uznanymi za refugia plejstoceny dla *P. sylvestris* (Tab. 18).

Test Mantela wykazał wysoce istotną ($p=0,001$) zależność między dystansem genetycznym Neia (Tab. 19) a położeniem geograficznym 32 prób sosny zwyczajnej. Średnia wartość współczynnika korelacji wynosi $R_{xy}=0,386$.

Tabela 18. Analiza molekularnej wariancji (AMOVA)

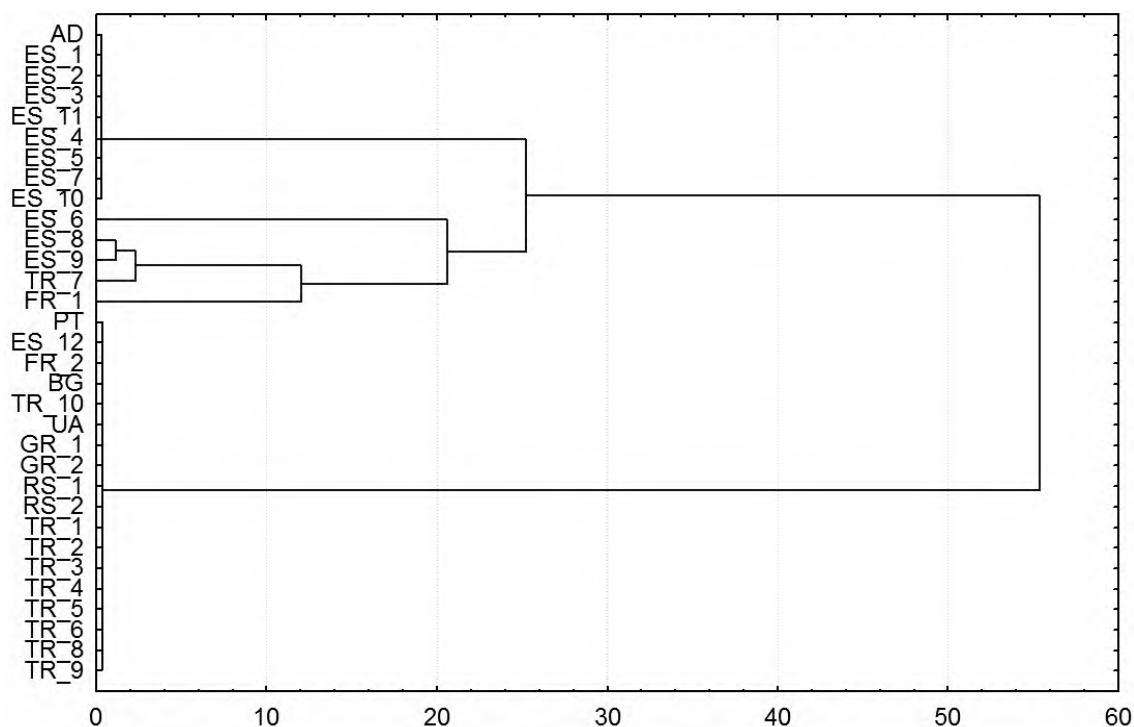
pochodzenie zmienności	Df	suma kwadratów	wariancja		Φ - statystyki
			całkowita	%	
między populacjami	31	396,15	0,43	91%	$\Phi_{PT}=0,91$ ($p \leq 0,01$)
wewnątrz populacji	924	40,84	0,04	9%	
całkowite	955	436,99	0,47	100%	
między regionami	4	283,09	0,41	69%	$\Phi_{RT}=0,69$ ($p \leq 0,01$)
między populacjami w regionach	27	113,06	0,14	23%	$\Phi_{PR}=0,76$ ($p \leq 0,01$)
wewnątrz populacji	924	40,84	0,04	7%	$\Phi_{PT}=0,93$ ($p \leq 0,01$)
całkowite	955	436,99	0,59	100%	

df – liczba stopni swobody



Rycina 43. Rozmieszczenie mitotypów populacji *Pinus sylvestris*. Akronimy jak w Tab. 1

Analiza dystansu genetycznego Neia potwierdziła podobieństwo populacji z Anatolii, Półwyspu Krymskiego i Bałkańskiego oraz Masywu Centralnego a także różnicowanie pomiędzy populacjami z Półwyspu Iberyjskiego (Tab. 19). Lepiej uwidocznione jest to na dendrogramie. Większość populacji tureckich (poza TR_7) oraz wszystkie populacje bałkańskie, jedna francuska (FR_2), portugalska i jedna hiszpańska (ES_12) tworzą jedną niezróżnicowaną grupę o wspólnym mitotypie *a*. Do grupy o mitotypie *b* wchodzi większość populacji hiszpańskich oraz andorska (AD). Do populacji, w których występuje zarówno mitotyp *a* jak i *b* (w różnych proporcjach) zaliczają się hiszpańskie populacje ES_6, ES_9 i ES_8, francuska FR_1 oraz wcześniej wspomniana turecka TR_7 (Ryc. 44).



Rycina 44. Dendrogram wykonany metodą Warda na wartościach dystansu genetycznego wg Neia dla 32 populacji *Pinus sylvestris*. Akronimy jak w Tab. 1

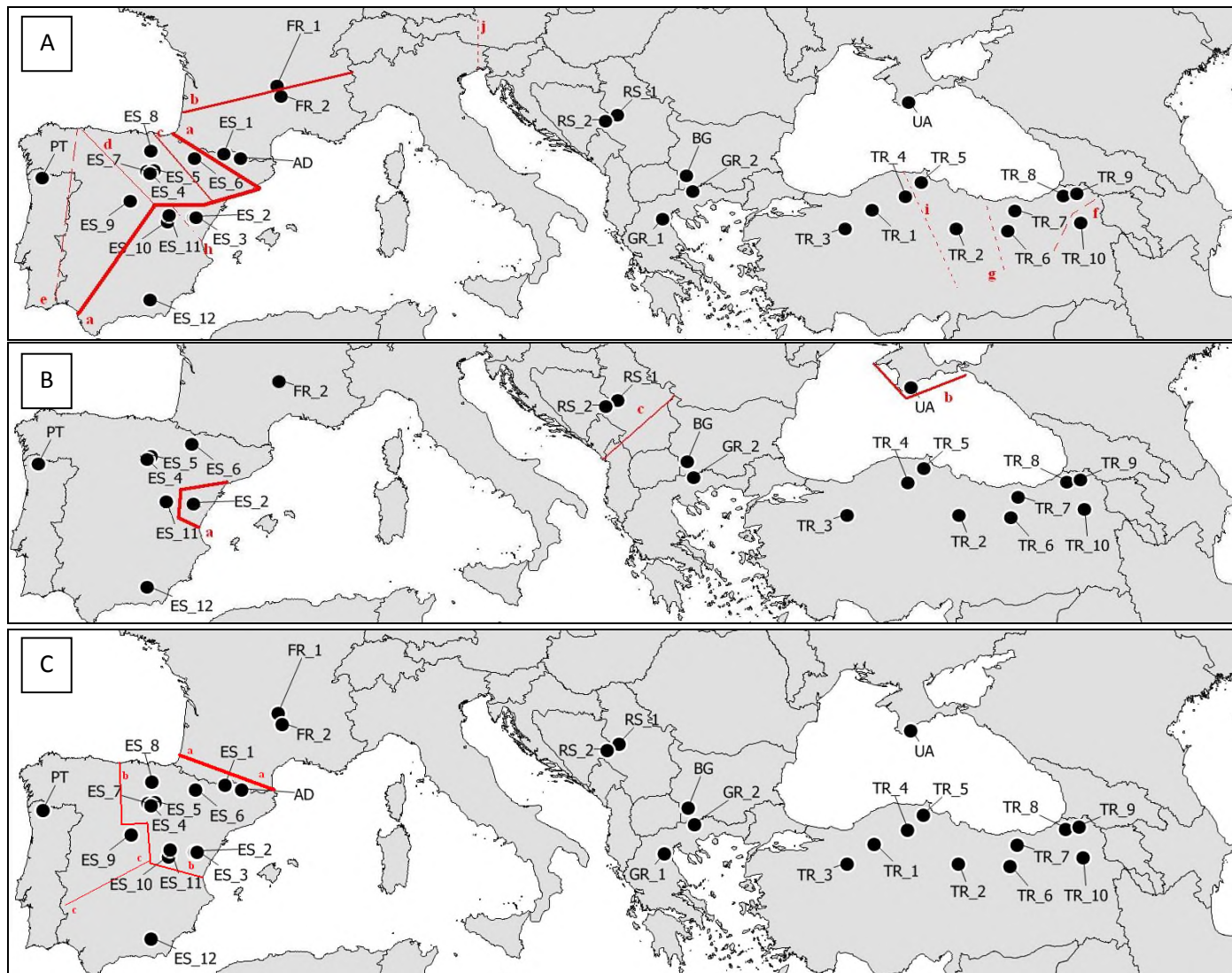
4.6. Bariery geograficzne

Na podstawie odległości Mahalanobisa wyliczonych oddzielnie w oparciu o cechy igieł i szyszek, a także dystansu genetycznego Neia wyznaczyłam bariery oddzielające grupy populacji różniące się najsilniej (Ryc. 45).

W przypadku barier wyznaczanych na podstawie cech igieł (Ryc. 45A) pierwsza granica (*a*) przebiega w poprzek Półwyspu Iberyjskiego oddzielając od siebie z jednej strony populacje z Sierra de Baza (ES_12), Serrania de Cuenca (ES_10, ES_11) i Sierra de Gúdar (ES_2, ES_3), z drugiej populacje zachodniej i północnej Hiszpanii i Portugalii. Dodatkowo bariera *a* odcina cały Półwysep Iberyjski na wysokości Pirenejów. Kolejna bariera (*b*) oddziela od siebie populacje pochodzące z Masywu Centralnego (FR_1 i FR_2). Dalej hierarchicznie wyznaczane są kolejne bariery – do najmniej znaczącej bariery *j*, która oddziela zachód od wschodu Europy i od Azji Mniejszej. Obraz ten jest identyczny z wynikiem analizy dyskryminacji (patrz Ryc. 39) i grupowaniem metodą Warda (Wyn. 37). Wyniki tych analiz są zbieżne przede wszystkim w miejscu przebiegu bariery *j*, która dzieli badane populacje na zachodnie (Półwysep Iberyjski i Masyw Centralny) i wschodnie (Półwysep Bałkański, Anatolia i Półwysep Krymski).

Przebieg barier obliczony w oparciu o cechy szyszek (Ryc. 45B) podkreśla odrębność populacji z Sierra de Gúdar (ES_2) oraz populacji z Krymu (UA) – linie *a* i *b*. Bariera *c* wyznacza granicę pomiędzy populacjami w podobny sposób jak powyżej, włączając do populacji zachodnich również populacje serbskie (RS_1 i RS_2).

Bariery wykreślone na podstawie dystansu genetycznego wskazują na odrębność populacji pochodzących z Półwyspu Iberyjskiego oraz na różnice pomiędzy populacjami leżącymi w obrębie Gór Iberyjskich a leżącymi w innych systemach górskich: Sierra de Baza (ES_12), Sierra de Gerês (PT) i Sierra de Guadarrama (ES_9) (Ryc. 45C).



Rycina 45. Rozmieszczenie barier geograficznych: A – na podstawie cech igieł, B – na podstawie cech szyszek, C – na podstawie badań genetycznych. Akronimy jak w Tab. 1

5. Dyskusja

5.1. Analizy biometryczne

5.1.1. Charakterystyka cech igiel

Długość igły (cecha 1) jest znacznie zmienna (Ryc. 20A), natomiast szerokość, wysokość oraz kształt przekroju igły (cecha 9, 10, 18) są umiarkowanie zmienne (Ryc. 20B). Długość igły (cecha 1) waha się w granicach 3,5-7,3 cm a szerokość (cecha 9) od 1,3-1,8 mm. Są to wielkości mieszczące się w granicach przedstawianych w literaturze (Wulf 1927; Sokołowski 1931; Zajączkowski 1936, 1949; Jordanov i in. 1963; Gaussen i in. 1964; Pravdin 1964; Marcet 1967; Żelawski i Gowin 1967; Staszkiwicz i Tyszkiewicz 1969; Pereira Coutinho 1974; Ruby i Wright 1976; Musil 1977; Seneta 1981; Davis 1984; Amaral Franco 1986; Vidaković 1991; Bobowicz i in. 1994, 1995, 2001 a i b, 2005, 2007; Christensen 1997; Galán Cela i in. 1998; Urbaniak 1998; Boratyńska i Hinca 2003; Marcysiak 2003; Urbaniak i in. 2003, 2006, 2008, 2009; Muchewicz 2007; Urbaniak i Vončina 2008; Kaundun i Lebreton 2009; Pawlaczyk i in. 2010).

Próby znalezienia zależności pomiędzy długością igły sosny zwyczajnej a położeniem geograficznym były podejmowane przez wielu autorów (Sokołowski 1931; Svoboda 1953; Pravdin 1964; Gaussen 1964; Staszkiwicz 1968; Urbaniak 1998; Pawlaczyk i in. 2010). Badania przedstawione w tej pracy nie wykazują zależności pomiędzy długością igiel a położeniem geograficznym czy wysokością nad poziomem morza, pomimo że w literaturze można znaleźć takie informacje. Przykładem mogą być *P. sylvestris* var. *nevadensis* i *P. sylvestris* var. *aquitana* (Amaral Franco 1986; Pardos i in. 1990; Boratyńska i Hinca 2003) oraz *Pinus hamata* (jeden z synonimów *P. sylvestris*) (Gaussen 1960; Pravdin 1964), opisywane jako taksony górskie, o krótszych igłach. Biorąc jednak pod uwagę, iż wszystkie prezentowane w niniejszej pracy próby są populacjami góorskimi (800-2010 m n.p.m.), pogląd ten nie w pełni znajduje potwierdzenie. Natomiast na podstawie badań przedstawionych w pracy mogą stwierdzić, że wraz ze wzrostem wysokości n. p. m. igły sosny zwyczajnej stają się szersze, grubsze i pokryte są grubszą warstwą epidermy (Ryc. 32), co nie było dotąd wykazywane w literaturze.

Zakres grubości igły (cecha 10) waha się od 0,6 do 0,9 mm (Ryc. 13B). Podobne wartości cechy podają Szweykowski (1969), Vidâkin (1981), Bobowicz i in. (1994, 1995, 2001 a i b, 2005, 2007) oraz Boratyńska i Hinca (2003).

Półkoliste przekroje igiel są typowe dla sosen z podsekcji *Sylvestres* (Little i Critchfield 1969). Współczynnik kształtu przekroju igły, obliczany jako stosunek wysokości do szerokości (Tab. 3) w badanych przez mnie populacjach wynosił przeciętnie od 0,47 do 0,56, z minimum 0,35 i maksimum 1,12 i był mało zmienny, z $V=4,7$ do 8,7%. Dane te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Bobowicz i in. 1994, 1995, 2001a i b, 2005, 2007; Muchewicz 2007; Pawlaczyk i in. 2010)

Liczba i położenie kanałów żywicznych należą do najbardziej zmiennych, a jednocześnie bardzo użytecznych cech w klasyfikacji gatunków rodzaju *Pinus* (Fieschi 1932; Staszkiwicz 1970; Vidâkin 1981; Patlaj 1984; Urbaniak 1998; Shue i in. 2003),

często uznawanymi za uwarunkowane genetycznie (Tûkin 1974; Urbaniak 1998, 2003, 2006). Przeciwnostawne zdania prezentowano stosunkowo rzadko (Sokolov 1928; Sokołowski 1931). Badane przeze mnie sosny z obszarów refugialnych charakteryzują się występowaniem przeciętnie od 6,75 do 11,07 kanałów żywicznych w poszczególnych populacjach. Liczby kanałów są odwrotnie skorelowane z wysokością n.p.m. populacji (Ryc. 14A, Ryc. 32), co potwierdza wcześniejsze doniesienia (Urbaniak 1998). Nie wykryłam natomiast zależności liczby kanałów od długości i szerokości geograficznej opisanej wcześniej (Pravdin 1964).

Odległość między wiązkami przewodzącymi (cecha 11) i wskaźnik Marceta (cecha 15) są jednymi z najbardziej zmiennych w zestawie analizowanych cech igieł *P. sylvestris*. Wartości pierwszej z nich wynosiły od 139 do 322 μm , drugiej od 258 do 689 (Ryc. 14B) i są porównywalne z podawanymi w literaturze (Marcet 1967; Musil 1977; Staszkiwicz i Tyszkiewicz 1968; Szweykowski 1969; Bobowicz i in. 1994, 1995, 2001 a i b, 2005, 2007; Pawlaczyk i in. 2010).

Wszystkie wartości cech opisujących położenie i liczbę aparatów szparkowych są porównywalne z wcześniejszymi doniesieniami (Marcet 1967; Staszkiwicz i Tyszkiewicz 1969). Liczby rzędów aparatów szparkowych oraz liczby aparatów szparkowych po do- i odosiowej stronie środkowych odcinków igieł sosny zwyczajnej należą do najmniej zmiennych z 22 analizowanych przeze mnie cech igieł tego gatunku. Po płaskiej stronie igły w większości populacji stwierdziłam niższą średnią liczbą rzędów (7,5-12,5; cecha 3) niż po stronie wypukłej (8,5-13,5; cecha 2), co jest zgodne z wynikami wcześniejszych opracowań (np. Żelawski i Gowin 1967; Urbaniak i in. 2003). W badanych populacjach nie stwierdziłam statystycznie istotnych różnic między liczbami aparatów szparkowych po płaskiej i wypukłej stronie igły (cechy 4 i 5), co również potwierdza informacje z literatury (Żelawski i Gowin 1967; Urbaniak i in. 2003; Pawlaczyk i in. 2010).

Wykazałam istnienie statystycznie istotnych różnic pomiędzy liczbą rzędów i liczbą aparatów szparkowych na igłach sosen z populacji iberyjskich oraz z Anatolii. Różnice te zdają się mieć charakter klinalny, bowiem populacje z masywu Centralnego i Półwyspu Bałkańskiego pod względem liczby rzędów i liczby aparatów szparkowych wykazują charakter pośredni pomiędzy iberyjskimi i anatolijskimi (Tab. 7; cechy: 4, 5, 16 i 17).

Pinus sylvestris charakteryzuje się najczęściej szerokimi i krótkimi, na przekrojach prawie kwadratowymi komórkami epidermy o okrągłym świetle (Jährig 1964; Staszkiwicz i Tyszkiewicz 1969; Szweykowski 1969; Muchewicz 2007; Pawlaczyk i in. 2010). Wykazałam, że pod względem kształtu komórek epidermy wśród badanych 32 populacji najbardziej wyróżniają się hiszpańska z Sierra de Baza (ES_12) i serbska RS_1. Pierwsza cechuje się wysokimi komórkami epidermy typowymi raczej dla *P. uncinata* Ramond (Muchewicz 2007), druga natomiast komórkami niskimi, jakby spłaszczonymi. Pozostałe populacje posiadają komórki epidermy typowe dla sosny zwyczajnej. Wysokość komórki epidermy (cecha 13) maleje wraz ze wzrostem szerokości geograficznej (Ryc. 33), co jest zgodne z wynikami wcześniejszymi (Sokolov 1928), chociaż na powierzchniach porównawczych, np. proweniencyjnych, różnice te zanikają (Urbaniak 1998).

Typowe dla *P. sylvestris* usytuowane wokół kanałów żywicznych komórki sklerenchymatyczne o bardzo grubych ścianach i niewielkim świetle przeważyły w igłach badanych populacji (cecha 21), jak i we wcześniejszych badaniach igieł *P. sylvestris* z południowych krańców zasięgu gatunki (np. Boratyńska i Boratyński 2007; Muchewicz 2007). Udział takich komórek zwiększał się wraz ze wzrostem długości geograficznej (Ryc. 24A). W przypadku komórek sklerenchymatycznych położonych pomiędzy wiązkami przewodzącymi (cecha 22) także obserwujemy zwiększający się udział komórek grubościennych wraz ze wzrostem długości geograficznej (Ryc. 24B).

5.1.2. Charakterystyka cech szyszek

W badanych przeze mnie populacjach długość szyszki (cecha 1) waha się od 40,6 do 52 mm a szerokość (cecha 2) od 20,7 do 27,8 mm. Są to wartości zbieżne z wcześniej podawanymi (Willkomm i Lange 1870; Wuf 1927; Sokołowskiego 1931; Staszkiwicz 1961, 1963, 1968; Jordanov i in. 1963; Gaussen i in. 1964; Pravdin 1964; Pereira Coutinho 1974; Seneta 1981; Amaral Franco 1986; Bobowicz i Korczyk 1990; Marcysiak 2003; Gücel i in. 2008). Nie wykazałam zależności długości szyszki od położenia geograficznego, co było wcześniej podawane w literaturze (Pravdin 1964).

W analizowanych populacjach wykazałam statystycznie istotny wzrost maksymalnej średnicy szyszki (cecha 2) oraz grubości tarczki (cecha 6) wraz ze wzrostem wysokości n.p.m. Dowiodłam także, że populacje południowe mają grubsze tarczki (Ryc. 35), czego nie podawano we wcześniejszych badaniach.

Liczba łusek (cecha 3) przypadająca na szyszkę wynosi przeciętnie od 64,4 do 86,9 (Ryc. 16A i C), co odpowiada liczbom wcześniej podawanym (Staszkiwicz 1961, 1963, 1968; Bobowicz i Korczyk 1990; Marcysiak 2003, 2006).

Długość, szerokość i grubość tarczki, odległość umbo od szczytu tarczki, stosunek długości tarczki do jej szerokości, stosunek długości tarczki do jej grubości oraz stosunek odległości umbo od szczytu tarczki do jej grubości (cechy: 4, 5, 6, 7, 13, 14 i 17) charakteryzują się zmiennością od znacznej po dużą (Ryc. 28 A-C), co na ogół jest zgodne z danymi z literatury (Staszkiwicz 1961, 1963, 1968, 1993). W badanych populacjach tarczki łusek miały średnią długość (cecha 4) od 6,4 do 9,2 mm i szerokość (cecha 5) od 7,6 do 9,6 mm. U szyszek sosny zwyczajnej brak jest wyraźnie odstających apofiz, co wpływa na grubość tarczki i odległość od wierzchołka tarczki do umbo (cechy 6 i 7). Grubość tarczki przyjmuje przeciętne wartości od 2,5 do 4,0 mm a odległość umbo od szczytu tarczki od 3,5 do 5,4 mm (Ryc. 18A i B).

5.2. Zróżnicowanie populacji sosny zwyczajnej w refugiach

Test Mantela wykazał wysoce istotną zależność między dystansem genetycznym Neia a odległościami geograficznymi pomiędzy populacjami. Świadczy to o zwiększaniu się poziomu różnic genetycznych pomiędzy porównywanymi populacjami wraz ze zwiększaniem się odległości pomiędzy nimi i wynika najprawdopodobniej z izolacji populacji *P. sylvestris* z obszarów refugium na terenie Półwyspu Iberyjskiego. Różnice pomiędzy iberyjskimi a dalej na wschód położonymi populacjami sosny zwyczajnej są spowodowane występowaniem i/lub brakiem jednej z dwóch form intronu *nad1* H/I mitochondrialnego DNA w populacjach sosny zwyczajnej z Anatolii, Półwyspu Krymskiego, Bałkańskiego i Masywu Centralnego (Tab. 19), stąd niniejszy wynik ma ograniczone znaczenie. Pomimo to stosunkowo wysoki procent wariancji wyjaśnionej w teście Mantela można wytłumaczyć historią gatunku, a szczególnie długą izolacją populacji na krańcach zasięgu. Różne populacje tego samego gatunku mogą posiadać swoją własną historię nawet w przypadku, gdy łączy je duży stopień pokrewieństwa i pochodzenie z tego samego refugium (Hewitt 1999; Marth i in. 2004; Tenailon i in. 2004; Bhagwat i in. 2008). We wcześniejszych badaniach genetycznych nie brano pod uwagę zjawisk demograficznych, ponieważ w większości przypadków historia wielu populacji była na ogół nieznana. Jednocześnie *P. sylvestris*, jako gatunek pionierski i występujący masowo lub przynajmniej w dużych liczbach osobników (Przybylski 1993; Willis i in. 1998; Krebs 1996), zwykle w trakcie migracji także pojawiał się w dużych ilościach (np. Birks 1989; Huntley i Birks 1983; Latałowa i in. 2004; Ralska-Jasiewiczowa i in. 2004).

Odmienność oraz duże zróżnicowanie sosny zwyczajnej na Półwyspie Iberyjskim wykazywane było już we wcześniejszych pracach z wykorzystaniem cech igieł (Gausson 1960; Pardos i in. 1990; Boratyńska i Hincă 2003), szyszek (Staszkiwicz 1963, 1968; Marcysiak 2003, 2006), terpenów (Tobolski i Hanower 1971; Semiz i in. 2007) jak i z użyciem markerów genetycznych takich jak izoenzymy (Kieliszewska-Rokicka 1981; Prus-Głowacki i Stephan 1994; Lewandowski i in. 2000; Scaltsoyiannes i in. 2009), chloroplastowe DNA (Robledo-Arnuncio i in. 2005; Cheddadi i in. 2006; Scafli i in. 2009; Soto i in. 2010), mitochondrialne DNA (Sinclair i in. 1999; Soranzo i in. 2000; Cheddadi i in. 2006; Labra i in. 2006; Naydenov i in. 2007; Pyhäjärvi i in. 2007 a i b) i sekwencje międzymikrosatelitarne ISSR (Labra i in. 2006). W niniejszych badaniach na obszarze Półwyspu Iberyjskiego wykazałam odrębność populacji z Sierra de Baza, Serra de Gerês i Sierra de Guadarrama, w których przeważał mitotyp *a*. Potwierdza to wyniki wcześniejszych badań przeprowadzonych przy użyciu tego samego markera genetycznego (Soranzo i in. 2000) (Ryc. 47). W hipotezie drugiej (patrz CEL str. 17) założyłam, że mitotyp *b* dominował w trzeciorzędowych populacjach sosny zwyczajnej w południowej Europie, natomiast mitotyp *a* występował w północnej części zasięgu gatunku. Świadczyć o tym może wykryte przez Naydenova i współpracowników (2007) występowanie mitotypu *b* na Bałkanach oraz w prezentowanej w tej pracy tureckiej populacji TR_7 (Ryc. 46A i B). W czasie zlodowaceń plejstocenijskich sosna z północy wycofała się na południe, do obszarów refugialnych, gdzie mogło dojść do wymieszania się mitotypów *a* i *b* oraz późniejszej dominacji mitotypu *a* we wschodnich refugiach oraz do pojawienia się tego mitotypu na Półwyspie Iberyjskim.

W przypadku hipotezy pierwszej, zakładającej współwystępowanie obu mitotypów na terenie całej Europy możliwe było również zastąpienie mitotypu *b* przez mitotyp *a* w czasie licznych wędrówek w okresach glacialno/interglacialnych. Prawdopodobne (szczególnie w odniesieniu do gatunku pionierskiego jakim jest sosna zwyczajna) jest wystąpienie wielokrotnego efektu „wąskiego gardła”, u podłoża którego leży kataklizm, którym niewątpliwie były liczne zlodowacenia (Eriksson 1998; Ábrahám i in. 2010). Liczebność populacji po katastrofie zmniejsza się, a zatem zmienia się pula genowa populacji. Osobniki, które przetrwały kataklizm nie mają wszystkich genów tworzących pulę genową całej populacji, a na pewno nie w tych samych proporcjach. „Wąskie gardło” powoduje zmniejszenie zmienności genetycznej oraz zmianę frekwencji alleli. Skoro sosna zwyczajna z Półwyspu Iberyjskiego nie brała udziału w rekolonizacji Europy (Gausson 1960; Prus-Głowacki i Stephan 1994; Sinclair i in. 1999; Lewandowski i in. 2000; Soranzo i in. 2000; Boratyńska i Hincă 2003; Robledo-Arnuncio i in. 2005; Cheddadi i in. 2006; Naydenov i in. 2007; Pyhäjärvi i in. 2007 a i b; Scafli i in. 2009; Soto i in. 2010) „wąskie gardło” może wyjaśnić niższy niż na Półwyspie Iberyjskim poziom zmienności genetycznej na terenach położonych na północ i wschód od Pirenejów (Ryc. 46 i 47) (Nei i in. 1975; Pyhäjärvi i in. 2007 a).

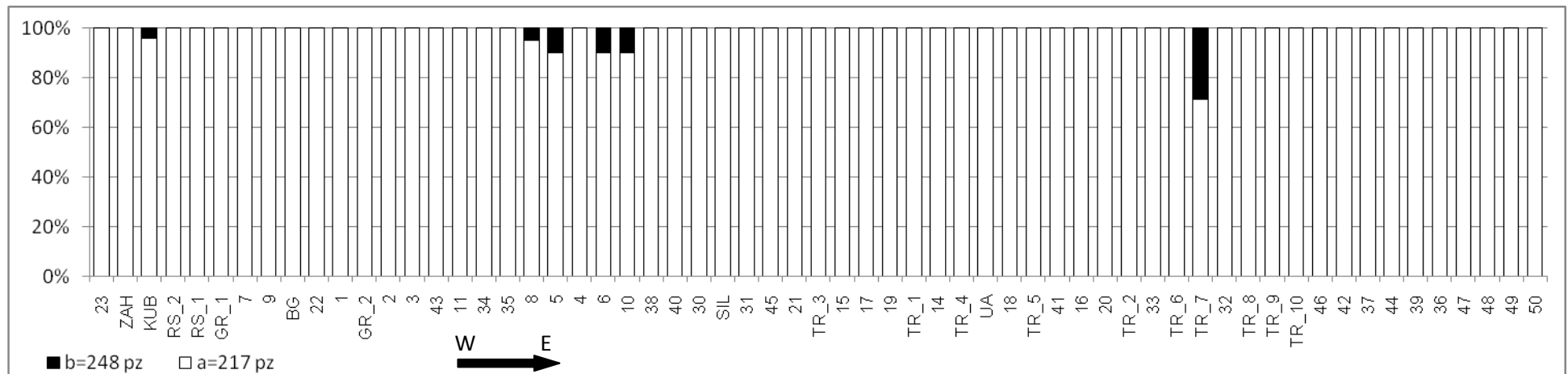
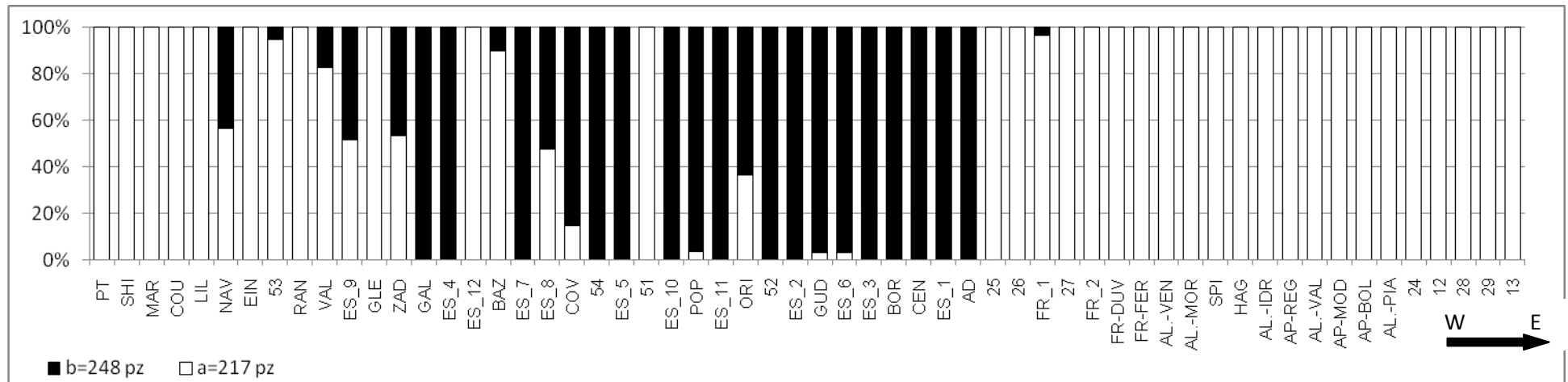
Obserwowany współczesny rozkład mitotypów *nad1* H/I u sosny zwyczajnej z Półwyspu Iberyjskiego i Masywu Centralnego sugeruje, że możliwa była wymiana genów pomiędzy refugiami w którymś z okresów interglacialnych. Można sobie wyobrazić, że *P. sylvestris* charakteryzująca się przewagą mitotypu *a*, rozprzestrzeniła się z Półwyspu Bałkańskiego, dotarła do Europy środkowej a następnie, u progu kolejnego zlodowacenia wycofała się przez obszary położone w zachodnich partiach Pirenejów, na tereny północno zachodniej części Półwyspu Iberyjskiego i dalej wzdłuż łańcuchów górskich – do Sierra Nevada i Sierra de Baza. Taberlet i in. (1998) opisuje możliwe drogi rekolonizacji Europy Centralnej i Północnej z terenów uznanych za refugia czwartorzędowe, także na Półwyspie Iberyjskim. Migracja z południa na północ przez Pireneje możliwa była dzięki dyssymetrii długości (Pireneje łagodnie opadają w kierunku Atlantyku, a w kierunku Morza Śródziemnego są coraz bardziej strome). Również czwartorzędowe zlodowacenia nie objęły tego obszaru (Calvet 2004). Petit i in. (1993, 2002 a, 2002 b), Dumolin-Lepègue i in. (1997) dla *Quercus ssp.* oraz Magri i in. (2006) i Demesure i in. (1996) dla *Fagus sylvatica* wyznaczyli drogi kolonizacji z refugiów w Hiszpanii, we Włoszech i na Bałkanach. Jedną z tras było obniżenie Pirenejów przy Atlantyku. Migracja z odwrotnego kierunku jest tym bardziej prawdopodobna, że Sinclair i in. (1999) wykorzystując marker mitochondrialny *Cox1* zaobserwował występowanie wspólnego mitotypu sosny zwyczajnej dla północno - wschodniej części Półwyspu Iberyjskiego, Alp i Skandynawii.

Analizy dyskryminacji i skupień oparte na cechach igieł i szyszek także wskazują na różnice pomiędzy populacjami *P. sylvestris* z Półwyspu Iberyjskiego w stosunku do pochodzących z Anatolii, Półwyspu Bałkańskiego i Krymskiego. Populacje z Masywu Centralnego umiejscowione są pomiędzy tymi grupami lub dołączają do części populacji leżących na wschód od Pirenejów. Wielkość i kształt szyszek sosny zwyczajnej różnią badane populacje w mniejszym stopniu, ale obraz geograficznego ich zróżnicowania jest podobny, ze skrajnymi populacjami iberyjskimi (do których dołącza FR_2) i tureckimi. Pomiedzy nimi uplasowały się populacje bałkańskie i krymska (Ryc. 40).

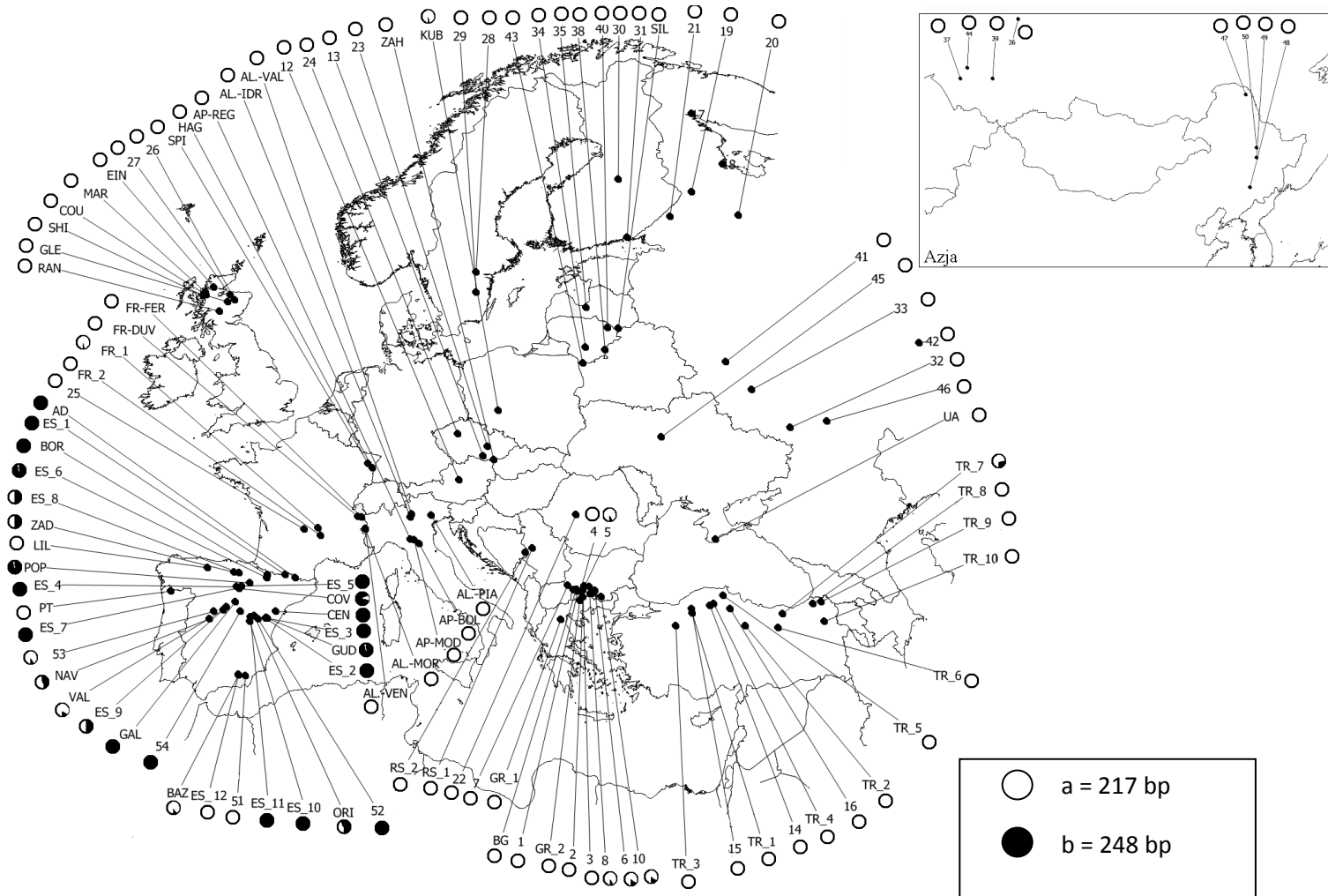
Analizy przeprowadzone w oparciu o cechy igieł i szyszek wyraźnie wskazują na odrębność trzech grup populacji. Pierwszą tworzą populacje Półwyspu Iberyjskiego, drugą z Anatolii i Półwyspu Krymskiego, a trzecią z Półwyspu Bałkańskiego. Populacje z Masywu Centralnego wykazują charakter pośredni, jednak bardziej zbliżone są do tych ze wschodniej części zasięgu gatunku. Nie można także wykluczyć wpływu sadzenia sosny pochodzącej z Łotwy w Masywie Centralnym a w konsekwencji pojawienia się tą drogą mitotypu *a* (Daszkiewicz i Oleksyn 2003, 2005).

Podsumowując należy stwierdzić, iż mitotyp *b* jak dotąd jest charakterystyczny głównie dla populacji z Półwyspu Iberyjskiego. Brak mitotypu *b* w większości populacji *P. sylvestris* ze środkowej Europy potwierdza tezę, że populacje iberyjskie tego gatunku nie brały udziału w kolonizacji obszarów położonych na północ od Pirenejów lub ich udział był wyjątkowo niski (Svoboda 1953; Gaussen 1960; Mirov 1967; Molotkov i Patlaj 1991; Prus-Głowacki i Stephan 1994; Soranzo i in. 2000; Naydenov i in. 2007; Pyhäjärvi i in. 2007 a i b).

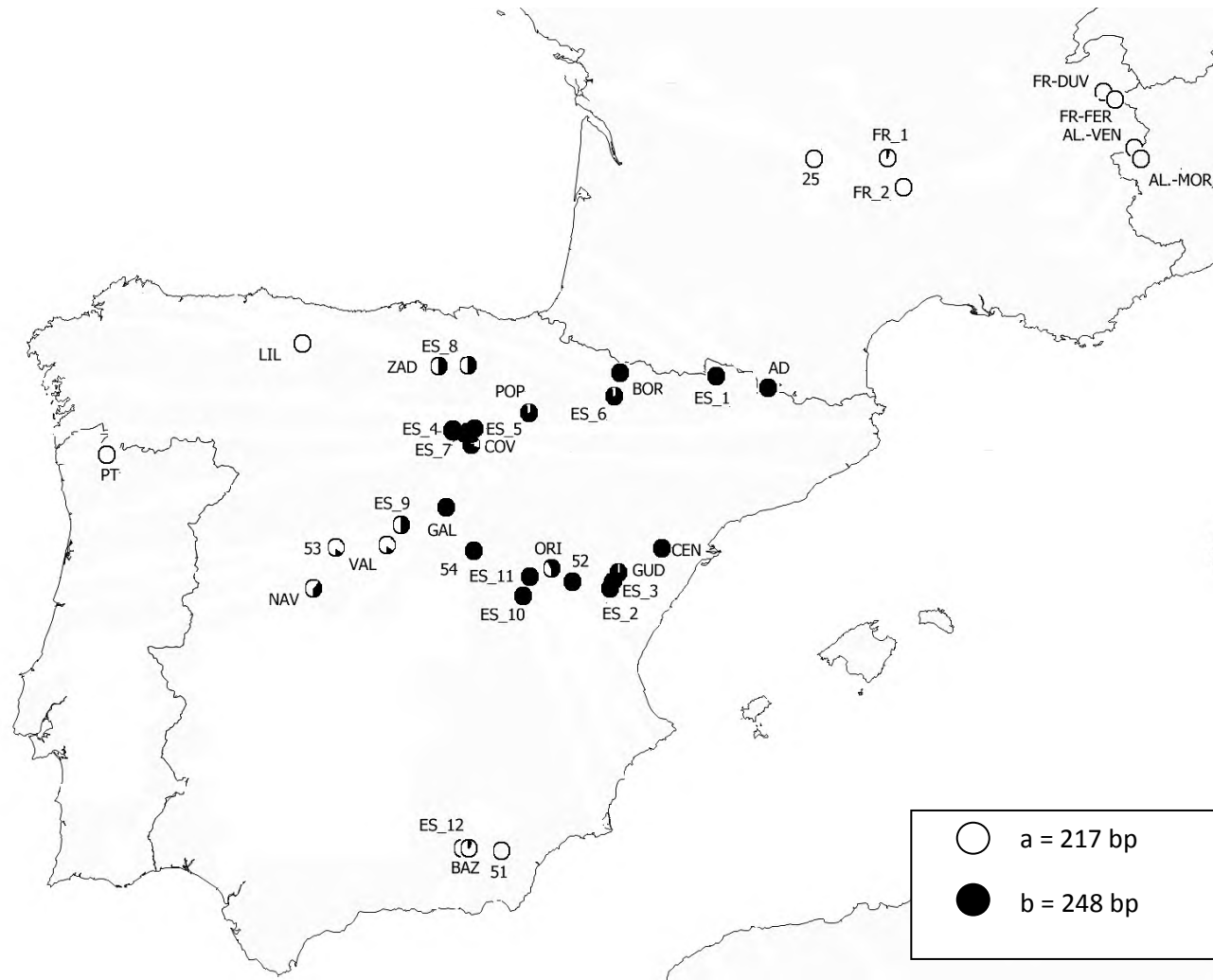
Analiza dyskryminacji oraz test Tukeya w oparciu o cechy biometryczne igieł i szyszek przedstawiły różnice pomiędzy populacjami ze wschodu (TR_6, TR_7, TR_8, TR_9, TR_10) i zachodu Półwyspu Anatolii (TR_4). Przy pomocy analiz genetycznych wykryłam obecność mitotypu *b* w populacji TR_7. Podobne zróżnicowanie populacji sosny zwyczajnej wykazali w badaniach izoenzymowych Bilgen i Kaya (2007). Czynnikiem, który przyczynia się do izolacji populacji sosny zwyczajnej ze wschodu Anatolii od pozostałych jest specyficzny układ łańcuchów górskich, tzw. „Anatolian diagonal”, spowodowane istnieniem systemu łańcuchów górskich łączących Góry Pontyjskich z Antytaurusem (Davis i in. 1971; Ekim i Güner 1986; Dogan i in. 2010), co umożliwiała migracje gatunków w trakcie zmian klimatycznych plejstocenu, w tym zapewne także migracje *P. sylvestris*.



Rycina 46A. Rozmieszczenie mitotypów populacji *Pinus sylvestris* w Europie i Azji. Akronimy jak w Tab. 1 oraz za Labra i in. (2006), Soranzo i in. (2000), Naydenov i in. (2007)



Rycina 46B. Rozmieszczenie mitotypów pop. *P. sylvestris* w Europie i Azji. Akronimy jak w Tab. 1 oraz za Labra i in. (2006), Soranzo i in. (2000), Naydenov i in. (2007)



Rycina 47. Rozmieszczenie mitotypów pop. *P. sylvestris* w Hiszpanii. Akronimy jak w Tab. 1 oraz za Labra i in. (2006), Soranzo i in. (2000), Naydenov i in. (2007)

5.3. Cechy wyróżniające taksony w obrębie *Pinus sylvestris*

Porównanie cech morfologicznych populacji podzielonych na klimatypy/ekotypy zgodnie z propozycjami Svobody (1953) oraz Ruby'ego i Wrighta (1976) z zastosowaniem testu Tukey'a wykazało, że istnieje między nimi szereg statystycznie istotnych różnic w wartościach wielu cech (Tab. 20-23). Wartości cech wyróżniających poszczególne klimatypy czy odmiany geograficzne pokrywają się często z wartościami sąsiednich klimatypów, jak np. *P.s. iberica* i *P.s. pyrenaica* odróżnianych w poprzednich badaniach (Ruby i Wright 1976) i można mówić o zmienności klinalnej większości z nich (Tab. 20 i 22). Kształt igły (cecha 18) oraz wysokości hypodermy i epidermy (cechy 14 i 13) odróżniają populacje z Półwyspu Iberyjskiego od pochodzących z obszarów refugialnych położonych dalej na wschód. Na podstawie testu Tukeya wykazałam, że *P.s. pyrenaica* charakteryzuje się najkrótszymi igłami (cecha 1) i najmniejszą liczbą aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły (cecha 5). Posiada także mniejszą liczbę kanałów żywicznych (cecha 8). Jednak w większości analizowanych cech nie jest odróżnialna od sąsiadujących z nią *P.s. iberica* i *P.s. aquitana*. Ta ostatnia wykazuje charakter pośredni pomiędzy wszystkimi analizowanymi próbami (Tab. 20-23). Staszkiwicz (1963) a później Daszkiewicz i Oleksyn (2003, 2005) podają przykłady na to, że duża część populacji z tego regionu mogła zostać wprowadzona z nasion pochodzących z regionu nadbałtyckiego. W pewnym zakresie przeczą temu doniesienia o sadzeniu w rejonie Masywu Centralnego sosen pochodzących z Pirenejów (Bartoli i Demesure-Musch 2003), a także wyniki analiz zmienności genetycznej *P. sylvestris* z Półwyspu Iberyjskiego i Masywu Centralnego na podstawie izoenzymów (Prus-Głowacki i Stephan 1994) oraz zmienność *P. uncinata* na podstawie *cpSSR* (Działuk i in. 2009), w których wykazano podobny wzorzec zmienności geograficznej obu gatunków. Można to interpretować jako potwierdzenie naturalnego pochodzenia populacji, analizowanych przez tych autorów.

Zarówno opisywane przez Ruby'ego i Wrighta (1976) odmiany geograficzne jak i ekotypy Svobody (1953) nie mogą być rozróżnialne na podstawie wartości cech szyszek, jakie uzyskałam w analizach biometrycznych. Szczególnie *P.s. iberica* i *P.s. aquitana* są nierozróżnialne w oparciu o zestaw wybranych cech (np. długość i szerokość szyszki, długość tarczki). Te same wnioski dotyczą *P.s. illyrica*, *P.s. rhodopea*, *P.s. armena*, *P.s. pontica* czy *P.s. caucasica*. Pomimo, że ich zasięgi odległe są od siebie o setki kilometrów brak jest między nimi różnic zarówno w cechach igieł (np. długości igieł, liczbie aparatów szparkowych czy kształcie igły) jak i szyszek (np. długości szyszki, długości i szerokości tarczki). Również w badaniach opartych o kształt apofiz na tarczках łusek (Staszkiwicz 1961, 1963, 1968; Pravdin 1964; Fijałkowski 1968; Svoboda 1971) Staszkiwicz (l.c.) podsumował, że o ile w przypadku populacji z północnej części zasięgu gatunku wydzielenie taksonów niższego rzędu jest możliwe, to w przypadku populacji południowych brak związku pomiędzy formami szyszek a opisanymi wcześniej rasami sosny zwyczajnej.

Tabela 20. Wynik testu Tukeya dla wybranych odmian geograficznych wg Ruby'ego i Wrighta (1976) w oparciu o 19 cech igieł; *NEVadensis*, *IBERICA*, *Pyrenaica*, *AQUitana*, *ILLyrica*, *RHOdopea*, *ARMena**

Nr	Cecha	NEV	IBE	PYR	AQU	ILL	RHO	ARM
1	Długość igły							
2	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły							
3	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły							
4	Średnia liczba aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły							
5	Średnia liczba aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły							
6	Liczba kanałów żywicznych po stronie wypukłej igły							
7	Liczba kanałów żywicznych po stronie płaskiej igły							
8	Suma kanałów żywicznych							
9	Szerokość igły na przekroju poprzecznym							
10	Wysokość igły na przekroju poprzecznym							
11	Odległość między wiązkami przewodzącymi							
12	Średnia szerokość komórki epidermy							
13	Średnia wysokość komórki epidermy							
14	Średnia wysokość komórki hypodermis							
15	Wskaźnik Marceta							
16	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły/Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły							
17	Średnia liczba aparatów szparkowych po wypukłej/średnia liczba aparatów szparkowych po płaskiej							
18	Wysokość igły/Szerokość igły							
19	Średnia szerokość komórki epidermy/Średnia wysokość komórki epidermy							

* przydział prób do poszczególnych odmian geograficznych

NEV	IBE	PYR	AQU	ILL	RHO	ARM
ES_12	PT; ES_2- ES_5	ES_1,6; AD	FR_1,2	RS_1,2	GR_1, 2; BG	UA; TR_1-TR_10

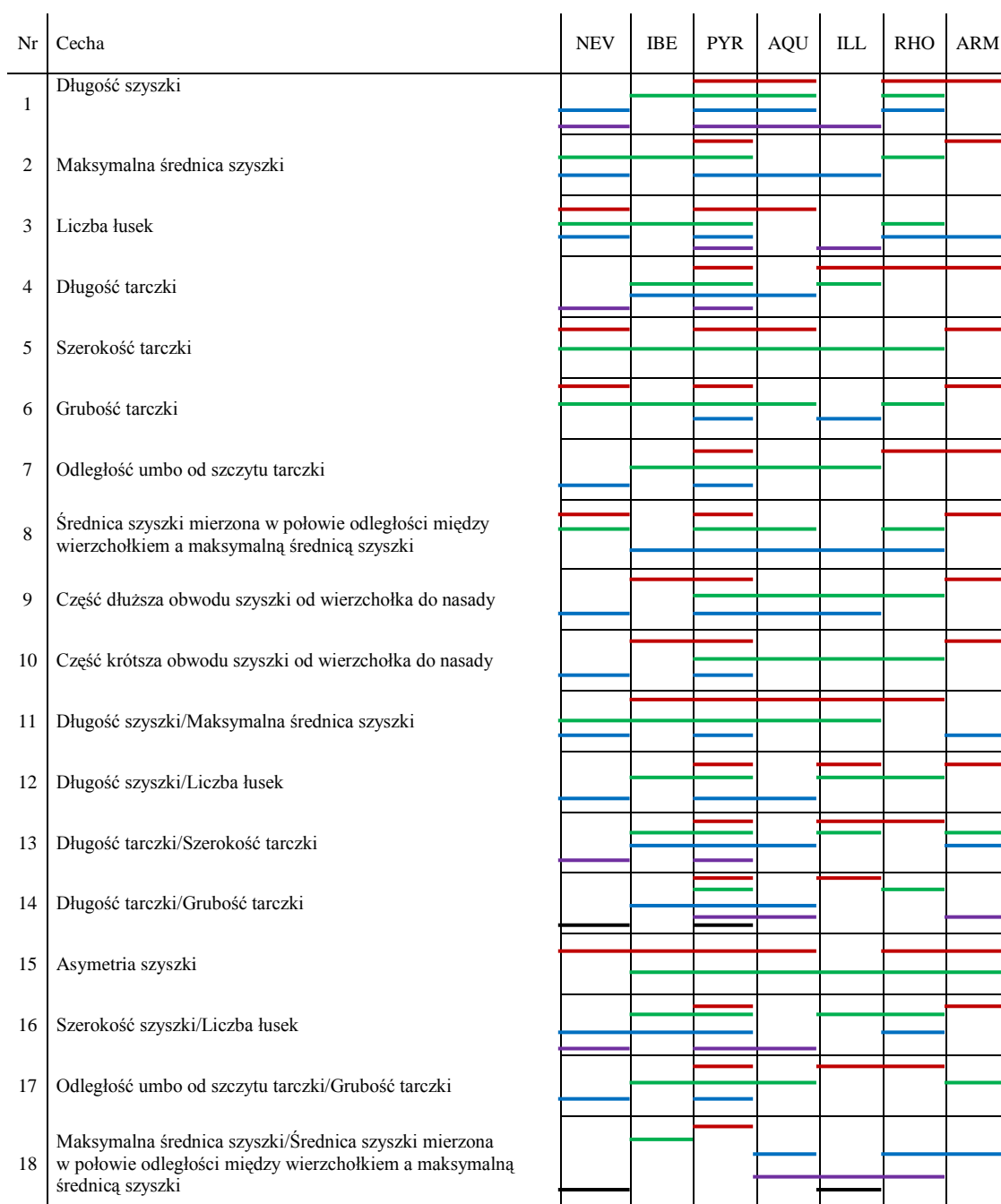
Tabela 21. Wynik testu Tukeya dla wybranych klimatypów wg Svobody (1953) w oparciu o 19 cech igieł; *NEVadensis*, *IBERICA*, *Pyrenaica*, *AQUitana*, *ILLYrica*, *RHOdopea*, *PONtica*, *CAUcasica**

Nr	Cecha	NEV	IBE	PYR	AQU	ILL	RHO	PON	CAU
1	Długość igły								
2	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły								
3	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły								
4	Średnia liczba aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły								
5	Średnia liczba aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły								
6	Liczba kanałów żywicznych po stronie wypukłej igły								
7	Liczba kanałów żywicznych po stronie płaskiej igły								
8	Suma kanałów żywicznych								
9	Szerokość igły na przekroju poprzecznym								
10	Wysokość igły na przekroju poprzecznym								
11	Odległość między wiązkami przewodzącymi								
12	Średnia szerokość komórki epidermy								
13	Średnia wysokość komórki epidermy								
14	Średnia wysokość komórki hypodermys								
15	Wskaźnik Marceta								
16	Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie wypukłej igły/Liczba rzędów aparatów szparkowych po stronie płaskiej igły								
17	Średnia liczba aparatów szparkowych po wypukłej/średnia liczba aparatów szparkowych po płaskiej								
18	Wysokość igły/Szerokość igły								
19	Średnia szerokość komórki epidermy/Średnia wysokość komórki epidermy								

* przydział prób do poszczególnych klimatypów

NEV	IBE	PYR	AQU	ILL	RHO	PON	CAU
ES_12	PT; ES_2- ES_5; ES_7-ES_11	ES_1,6; AD	FR_1,2	RS_1,2	GR_1, 2; BG	TR_1-TR_7	UA; TR_8- TR_10

Tabela 22. Wynik testu Tukeya dla wybranych odmian geograficznych wg Ruby'ego i Wrighta (1976) w oparciu o 18 cech szyszek; *NEVadensis*, *IBERICA*, *Pyrenaica*, *AQUitana*, *ILLyrica*, *RHODOpea*, *ARMena* *



* przydział prób do poszczególnych odmian geograficznych

NEV	IBE	PYR	AQU	ILL	RHO	ARM
ES_12	PT; ES_2,4,5,11	ES_6	FR_2	RS_1,2	GR_2; BG	UA; TR_2-TR_10

Tabela 23. Wynik testu Tukeya dla wybranych odmian geograficznych wg Svobody (1953) w oparciu o 18 cech szyszek; *NEVadensis*, *IBERICA*, *Pyrenaica*, *AQUitana*, *ILLyrica*, *RHODOpea*, *PONtica*, *CAUCasica**

Nr	Cecha	NEV	IBE	PYR	AQU	ILL	RHO	PON	CAU
1	Długość szyszki								
2	Maksymalna średnica szyszki								
3	Liczba łusek								
4	Długość tarczki								
5	Szerokość tarczki								
6	Grubość tarczki								
7	Odległość umbo od szczytu tarczki								
8	Średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki								
9	Część dłuższa obwodu szyszki od wierzchołka do nasady								
10	Część krótsza obwodu szyszki od wierzchołka do nasady								
11	Długość szyszki/Maksymalna średnica szyszki								
12	Długość szyszki/Liczba łusek								
13	Długość tarczki/Szerokość tarczki								
14	Długość tarczki/Grubość tarczki								
15	Asymetria szyszki								
16	Szerokość szyszki/Liczba łusek								
17	Odległość umbo od szczytu tarczki/Grubość tarczki								
18	Maksymalna średnica szyszki/Średnica szyszki mierzona w połowie odległości między wierzchołkiem a maksymalną średnicą szyszki								

* przydział prób do poszczególnych klimatypów

NEV	IBE	PYR	AQU	ILL	RHO	PON	CAU
ES_12	PT; ES_2,4,5,11	ES_6	FR_2	RS_1,2	GR_2; BG	TR_2-TR_7	UA; TR_8-TR_10

6. Wnioski

1. Na podstawie morfologii i anatomii igieł populacji z obszarów uznanych za ostoje flor trzeciorzędowych wyodrębniają się dwie wyraźne grupy: 1) iberyjska i 2) składająca się z południowych populacji leżących na wschód od Pirenejów: Masywu Centralnego, Bałkanów, Anatolii i Półwyspu Krymskiego. Populacje z tych grup różnią się głównie występowaniem różnych typów komórek sklerenchymatycznych.
2. Pomiary cech szyszek *Pinus sylvestris* różnicują badane populacje w mniejszym stopniu. Mimo to można wśród nich wyróżnić te same grupy, co na podstawie cech igieł. Różnice zaznaczają się przede wszystkim w liczbie łusek przypadającej na długość i szerokość szyszki.
3. Badania z użyciem markera mitochondrialnego *nad1* H/I wykazały istnienie dwóch mitotypów, z których mitotyp *b* występuje jedynie w refugiach, w przewadze na Półwyspie Iberyjskim. Mitotyp *a* przeważa we wschodniej i północnej części zasięgu sosny zwyczajnej.
4. Poziom zmienności morfologicznej zarówno w oparciu o cechy igieł jak i szyszek jest znacznie wyższy od zmienności genetycznej wyznaczonej na podstawie jednego markera genetycznego.
5. Marker mitochondrialny *nad1* H/I jest wysoce specyficzny względem różnych części zasięgu sosny zwyczajnej; wskazuje na wyjątkowość populacji z Półwyspu Iberyjskiego względem populacji z centralnej i północnej Europy oraz zachodniej części Azji.
6. Wyniki wszystkich analiz są zbieżne, a badania biometryczne w oparciu o cechy igieł, szyszek jak i analizy genetyczne potwierdzają istnienie dwóch grup populacji.
7. Zróżnicowanie geograficzne cech szyszek i igieł oraz udziału mitotypów nie pozwala odróżnić taksonów niższego rzędu opisanych przez Svobodę (1953) i Ruby'ego i Wrighta (1976) z południowej Europy i południowo-zachodniej Azji. Na podstawie biometrii szyszek i igieł oraz rozmieszczenia wybranego mitotypu brak jest podstaw do wydzielenia dla *Pinus sylvestris* taksonów niższego rzędu.
8. Wykrycie mitotypu *b* w jednej ze wschodnich populacji sosny zwyczajnej w Turcji, jego obecność na Bałkanach i dominacja na Półwyspie Iberyjskim zdaje się potwierdzać hipotezę o trzeciorzędowym podziale populacji na północne charakteryzujące się mitotypem *a* i południowe z dominacją mitotypu *b*. Jednakże pojawienie się mitotypu *b* w niewielkiej domieszce w populacji z Masywu Centralnego i Polski może być argumentem potwierdzającym współwystępowanie obu mitotypów w trzeciorzędzie w całym zasięgu. Wobec powyższego problem pozostaje nierozwiązany.

7. Literatura

- Ábrahám B., Miklóssy I., Kovács E., Tamás É., Mészáros I., Szilveszter S., Brezeanu A., Lányi S. 2010. Genetic Analysis of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus sylvestris* forma *turfosa* L. Using RAPD Markers. *Notulae Scientia Biologicae* 2 (1): 129-132.
- Amaral Franco J. 1986. *Pinus* L. W: Castroviejo S., Lainz M., López González G., Montserrat P., Muñoz Garméndia F., Paiva J., Villar L. (Red.), *Flora Iberica* 1: 168-174. Real Jardín Botánico & C.S.I.C., Madrid.
- Andel T. H. van 2002. The climate and landscape of the middle part of Weichselian Glaciation in Europe: The stage 3 project. *Quaternary Research* 57: 2–8.
- Aseginolaza Iparragirre C., Gómez García D., Lizaur Sukia X., Montserrat Martí G., Morante Serrano G., Salaverria Monfort M., Uribe-Echebarria Díaz P. 1985. Catálogo florístico de Álava, Vizcaya y Guipúzcoa. Servicio Central de publicaciones del Gobierno Vasco, ss. 1149.
- Bałut S. 1969. Zmienność szyszek modrzewia jako podstawowe wyróżnianie pochodzeń. Cz. I-III. *Acta Agr. Silv. Ser. Silv.* 9: 3-109.
- Barbarič A. I., Dobročeva D. N., Dubovik O. N. 1986. Chorologija flory Ukrainy. Naukova Dumka, Kiev.
- Bartoli M., Demesure-Musch B. 2003. Plus d'un siècle d'intervention humaine dans les flux des genes des Pins à crochets et Sapins français. *Revue Forestière Française* 6: 543-556.
- Barulina E. I. 1930. Cecevicica SSSR i drugih stran. *Sb. nauchnykh trudov po prikladnoi botanike, genetika i selektsii* 40: 23-32.
- Beaulieu J. L., Reille M., 1984. A long Upper Pleistocene pollenrecord from Les Echets, near Lyon, France. *Boreas* 13, 111–132.
- Benito Garzón M., Sánchez de Dios R., Sáinz Ollero H. 2007. Predictive modelling of tree species distribution on the Iberian Peninsula during Last Glacial Maximum and Mid-Holocene. *Ecography* 30:120–134.
- Berg R. L. 1964. Korreljacionnye plejady i stabilizirujuščij otbor. *Prim. Mat. Met. Biol.* 4: 39-48.
- Bhagwat S. A., Willis K. J. 2008. Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits?. *Journal of Biogeography* (35): 464-482.
- Bilgen B. B., Kaya N. 2007. Allozyme variations in six natural populations of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Turkey. *Biologia* 62: 697-703.
- Birks H. J. B. 1989. Holocene isochrones maps and patterns of tree-spreading in the British Isles. *Journal of Biogeography*, 16: 503-540.
- Bobowicz M. A. 1988. Differentiation of *Pinus sylvestris* L., *Pinus mugo* Turra, Pines from Bór na Czerwonem in Traits of One – and Two-years-old cones. *Bulletin de la Societe des Amis des Scientes et des Lettres de Poznań, Serie D-26*, ss. 99-108.
- Bobowicz M. A., Korczyk A. 1990. Intrapopulational variability of *Pinus sylvestris* L. from Supraśl expressed in traits of needles and cones. *Bulletin de la Societe des Amis des Scientes et des Lettres de Poznań, Serie D-28*, ss. 41-58.

- Bobowicz M. A., Korczyk A. F., Breninek J. 1994. Variability of *Pinus sylvestris* L. plus trees of eight Polish provenances in traits of needle morphology and anatomy. *Biological Bulletin of Poznan*, 31: 33-49.
- 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., Pawlaczyk E. M., Korczyk A. F. 2001a. The variation of the oldest trees in the natural Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) population of the Knyszyn Forest. Part I. The diversity in traits of needle anatomy. *Roczniki Dendrologiczne Akademii Rolniczej w Poznaniu* 49: 97-107.
- Bobowicz M. A., Pawlaczyk E. M., Zaborowska K. 2005. Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from experimental plot in the Polanica Zdrój, in relation to the variability of maternal population from the top of the Szczeliniec Wielki mountain, expressed in morphology and anatomy of the needles. W. Prus-Głowacki W., Pawlaczyk E.M. *Variability and Evolution – new perspectives*. Poznań Wydawnictwo Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, 321-339.
- Bobowicz M.A., Pawlaczyk E. M., Korczyk A.F. 2001b. The variation of the oldest trees in the natural Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) population of the Knyszyn Forest. Part II. Interpopulation variability in traits of needle anatomy among mature trees from Poland and the oldest trees from the Knyszyn Forest. *Roczniki Dendrologiczne Akademii Rolniczej w Poznaniu* 49: 109-122.
- Bobowicz M.A., Pieczyńska B., Sufryd A., Breninek J., Korczyk A. F. 1995. Interprovenance variability of half-sib Scots pine progenies in traits of needle morphology and anatomy. *Biological Bulletin of Poznan* 32: 43-57.
- Bobrov E.G. 1975. *Pinus sylvestris* s. L. na Kavkazie, istorija i sistematica. *Botaniceskij Žurnal* 60 (10): 1421-1433.
- Bogucki Z. 1979. *Elementy statystyki dla biologów*. Wyd. UAM, Poznań.
- Boratyńska K., Bobowicz A. M. 2001. *Pinus uncinata* Ramond taxonomy based on needle characters. *Plant Systematics and Evolution* 227: 183-194.
- Boratyńska K., Boratyński A. 2007. Taxonomic differences among closely related pines *Pinus sylvestris*, *P. mugo*, *P. uncinata*, *P. rotundata* and *P. uliginosa* as revealed in needle sclerenchyma cells. *Flora* 202: 555-569.
- Boratyńska K., Boratyński A., Browicz K., Hantz J. 1981. *Atlas rozmieszczenia drzew i krzewów w Polsce* 29. PWN, Warszawa-Poznań.
- Boratyńska K., Hinca M. 2003. Morphological characteristic of *Pinus sylvestris* L. in the southernmost, isolated locality in the Sierra de Baza (S Spain) as expressed in the needle traits. *Dendrobiology* 50: 3-9.
- Boratyński A. 1991. Range of natural distribution. W: Giertych M., Mátyás C. (Red.) *Genetics of Scots pine*, s. 19-30. Akadémiai Kiadó, Budapest, HU.
- Boratyński A. 1993. Systematyka i geograficzne rozmieszczenie. W Białobok S., Boratyński A., Bugała W (Red). *Biologia sosny zwyczajnej*. Ss. 45-69. Polska Akademia Nauk Instytut Dendrologii, Kórnik.
- Boratyński A., Browicz K., Zieliński J. 1992. *Chorology of Trees and Shrubs in Greece*. Sorus, Poznań – Daszewice.

- Bottema S. 1975. Reconstruction of the late Quaternary vegetation of north western Greece. W: Problems of Balkan Flora and Vegetation, s. 58-63. Publishing
- Browicz K. 1994. Chorology of Trees and Shrubs in South-West Asia and Adjacent Regions, vol. 10. Polish Academy of Sciences Institute of Dendrology, Kórnik.
- Calvet, 2004 M. The Quaternary glaciations of the Pyrenees. W: Ehlers J., Gibbard P.L. (Red.), Quaternary Glaciations — Extent and Chronology, Elsevier, Amsterdam, s.119-128.
- Carreras Raurell J., Carrillo Ortuño E., Masalles Saumell R. M., Ninot Sugrañes J. M., Vigo i Bonada J. 1993. El poblament vegetal de les Valls de Barravés i de Castanesa. Acta Botanica Barcinonensia 42: 3-392.
- Cheddadi R., Vendramin G., Litt T., François L., Kageyama M., Lorentz S., Laurent J. M., Beaulieu J. L. de, Sadori L., Jost A., Lunt D. 2006. Imprints of glacial refugia in the modern genetic diversity of *Pinus sylvestris*. Global Ecology and Biogeography, 15: 271-282.
- Christensen K. 1987. A morphometric Study of the *Pinus mugo* Turra complex and its natural hybridization with *Pinus sylvestris* L. (Pinaeae); Feddes Repertorium 98 (11 – 12): 623-635.
- Christensen K. I. 1986. *Pinus* L. W: Strid A. (Red.), Mountain flora of Greece 1: 41-44. Cambridge University Press, Cambridge.
- Christensen K. I. 1997. *Pinus* L. W. Phitos D., Strid A., Snogerup S. (Red). Flora Hellenica, s. 6.
- Christensen K. I., Dar G. H. 1997. A morphometric analysis of spontaneous and artificial hybrids of *Pinus mugo* × *sylvestris* (Pinaceae). Nordic Journal of Botany 17 (1): 77-86.
- Coode M. J. E., Cullen J. 1965. *Pinus* L. W: Davies P. H. (Red.), Flora of Turkey 1, s. 72-75.
- Costa Tenorio M., Morla A. C., Sainz Ollero H. (Red.), 1997. Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica. Editorial Planeta. Madrid.
- Critchfield W. B., Little E. L., 1966. Geographic distribution of the pines of the World. U. S. Dept. Of Agricult., Forest Service, Misc. Public. 991, Washington.
- Czeczott H. 1939. A kontribution to the knowledge of the Flora and Vegetation of Turkey. Feddes Repert., Beihefte 107.
- Daszkiewicz P., Oleksyn J. 2003. W poszukiwaniu sosny masztovej: “Misja Chersońska”, szpiegowska operacja wywiadu króla Francji w lasach Rzeczpospolitej w świetle dokumentów z paryskiego archiwum marynarki. Sylwan 3: 71-83.
- Daszkiewicz P., Oleksyn J. 2005. Introdukcja “sosny ryskiej” w osiemnasto- i dziewiętnastowiecznej Francji. Rocznik dendrologiczny 53: 7-40.
- Davis P.H. 1984. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 1. University Press, Edinburgh, 72-74.
- Davis P.H., Harper P. C., Hedge I. C. 1971. Plant Life of South West Asia. The Botanical Society of Edinburgh
- Demesure B., Comps B., Petit R. 1996. Chloroplast DNA phylogeography on the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. Evolution 50 (6): 2515-2520.

- Dogan B., Duran A., Bagci Y., Dinc M., Martin E., Cetin O., Ozturk M. 2010. Phylogenetic relationships among the taxa of the genus *Johrenia* D. C. (Apiaceae) from Turkey based on molecular method. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 17 (2): 113-120.
- Dumolin S., Demesure B., Petit R. J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1253-1256.
- Dumolin-Lapègue S., Demesure B., Le Corre V., Fineschi S., Petit, R. J. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487.
- Dzialuk A., Muchewicz E., Boratyński A., Montserrat J. M., Boratyńska K., Burczyk J. 2009. Genetic variation of *Pinus uncinata* (Pinaceae) In the Pyrenees determined with cpSSR markers. *Plant Systematics and Evolution* 277: 197-205.
- Eckenwalder J. E. 2009. *Conifers of the World. The complete reference.* Timber Press, Portland-London.
- Ekim T., Güner A. 1986. The Anatolian Diagonal: fact or fiction? *Proc. Royal Soc. Edinburgh* 89B: 69-77.
- Eliçin G. 1970 a. Türkiye sarıçam (*Pinus sylvestris* L.)'larında morfogenetik araştırmalar. *Istanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, Ser. A* 20 (1): 144-186.
- Eliçin G. 1970 b. Türkiye'de sarıçam (*Pinus sylvestris* L.)'in ekolojik alt türü. *Istanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, Ser. A* 20 (2): 289-299.
- Eriksson G. 1998. Evolutionary forces influencing variation among populations of *Pinus sylvestris*. *Silva Fennica* 32 (2): 173-184.
- EUFORGEN 2009. Distribution map of Scots pine (*Pinus sylvestris*). www.euforgen.org.
- Falińska K. 2004. *Ekologia roślin.* Wydanie 3, PWN.
- Farjon A. 1984. *Pines.* Brill, Leiden, s. 199-206.
- Farjon A. 1998. *World Checklist and Bibliography of Conifers.* W: Royal Botanic Gardens Press, Kew, London s. 55-83.
- Farjon A. 2008. *A natural history of Conifers.* Timber Press.
- Farjon A. 2010. *A handbook of the world's Conifers. Vol. II,* Brill Leiden-Boston.
- Fenaroli L., Gambi G. 1976. *Alberi.* Museo Tridentino de Scienze Naturali, Trento.
- Field M. H., de Beaulieu J. L., Guiot J., Ponel P. 2000. Middle Pleistocene deposits at La Côte, Val-de-Lans, Isère department, France: plant macrofossil, palynological and fossil insect investigations. *Palaeogeogr Palaeoclimat Palaeoecol* 159: 53-83.
- Fieschi V. 1932. Anatomie de la feuille chez les pins maritimes. *Bull. Soc. Histoire natur.* 64.
- Fijałkowski D. 1968. Zmienność sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. w województwie lubelskim. *Annales UMCS, Sect. C* 22 (12): 181-201.
- Florin R. 1963. The distribution of Conifer and Taxad Genera in Time and Space. *Acta Horti Berg.* 20 (4): 121-312.
- Font Quer, P. 1954. *La vegetación;* W: Terán, M. (Red.), *Geografía de España y Portugal,* Montaner y Simón.

- Galán Cela P., Gamarra Gamarra R., García Viñas J. I. 1998. Árboles i arbustos de la Peninsula Ibeérica e Islas Baleares. Ediciones Jaguar S. A., Madrid, 57-58.
- Gandouin E., Franquet E. 2002. Late Glacial and Holocene chironomid assemblages in 'Lac Long Inférieur' (Southern France, 2090 m): palaeoenvironmental and palaeoclimatic implications. *J Palaeolimnol* 28: 317-328.
- Gaussen H. 1960. Les Gymnospermes actuelles et fossils. *Travaux du Laboratoire Forestal de Toulouse* 4, ss. 272.
- Gaussen H., Heywood V. H., Chater A. O. 1964. *Pinus* L. *Flora Europea* 1: 32-35.
- Geda López, G., K. Kamiya, and K. Harada. 2002. Phylogenetic relationships of *Diploxylon* pines (subgenus *Pinus*) based on plastid sequence data. *International Journal of Plant Sciences* 163: 737-747.
- Gernandt, D. S., Geda López G., Ortiz García S., Liston A. 2005 Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54 (1): 29-42.
- Giertych M., Mátyás C. (Red.). 1991. Genetics of Scots Pine. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- González-Sampériz P., Valero-Garcés B. L., Carrión J. S., Peña-Monné J. L., García-Ruiz J. M., Martí-Bono C. 2005. Glacial and Late glacial vegetation in northeastern Spain: new data and a review. *Quat Int* 140-141: 4-20.
- Gruber M. 1979. Le pin sylvestre dans les vallées d'Aure et de Louron (Pyrénées Centrales). *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 115 (1-2): 181-190.
- Grubov V. I. 1982. *Opredelitel' sosudistych rastenij Mongolii*. Nauka, Leningrad.
- Gücel S., Özkan K., Çelik S., Yücel E., Öztürk M. 2008. An over view of the geobotanical structure of Turkish *Pinus sylvestris* and *Carpinus betulus* forests. *Pakistan Journal of Botany* 40 (4): 1497-1520.
- Haeupler H., Schönfelder P. 1989. Atlas der Fern- und Blütenpflanzen der Bundesrepublik Deutschland. Ulmer, Stuttgart.
- Hewitt G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hewitt G. M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.
- Hultén E., Fries M. 1986. Atlas of North European vascular plants. North of the tropic of cancer. T. 2. Koeltz Scientific Books. Federal Republic of Germany.
- Huntley B., Birks H. J. B. 1983. An Atlas of Past and Present Pollen Maps for Europe 0-13,000 y Years Ago. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jährig M. 1964. Beiträge zur Nadelanatomie Und Taxonomie der Gattung *Pinus* L. *Willdenowia* 3: 329-366.
- Jalas, Suominen (Red.), 1973. Atlas Florae Europaeae. Distribution of Vascular Plants in Europe. 2 Gymnospermae; Helsinki.
- Jasičova M. 1966. *Pinus* L. W: Futák J. (Red.), *Flora Slovenska* 2: 278-294. Vyd. Akad. Vied, Bratislava.
- Jordanov D, Kitanov B, Vălev St. (Red.), 1963. Flora na Narodna Riepublika Bylgarija. Sofia, Izdatielstvo na Bylgarskata Akademija na Naukite, s. 160-166.

- Kaundun S. S., Lebreton P. 2010. Taxonomy and sistematics of the genus *Pinus* based on morphological, biogeographical and biochemical characters. *Plant Systematics and Evolution* 284: 1-15.
- Keng H., Little E. L. 1961. Needle characteristics of hybrid pines. *Silvae Geneticae* 10 (5): 131-46.
- Kieliszewska-Rokicka B. 1981. Geographic and climatic differentiation of electrophoretic forms of esterase, glutamate dehydrogenase and peroxidase in Scots pine tissues. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 50 (3): 481-492.
- Koehne E. 1893. *Deutsche Dendrologie*. F. Enke; Stuttgart.
- Krebs C. J. 1996. *Ekologia. Eksperymentalna analiza rozmieszczenia i liczebności*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, ss. 735.
- Krupkin, A. B., A. Liston, and S. H. Strauss. 1996. Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*) from chloroplast DNA restriction site analysis. *American Journal of Botany* 83: 489-498.
- Krüssmann G. 1972. *Handbuch der Nadelgehölze*. Paul Parey, Berlin–Hamburg.
- Krzakowa M., Naganowska B., Bobowicz M. A. 1984. Investigations on taxonomic status of *Pinus uliginosa* Neumann. *Bull. Soc. Amis Sci. Lett. Poznań, D*, 24: 87-96.
- Krzysztofiak M., Urbanek D. 1975. *Metody statystyczne*. PWN, Warszawa.
- 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.
- Latałowa M., Tobolski K., Nalepka D. 2004. *Pinus* L. subgenus *Pinus* (subgen. *Diploxylon* (Koehne) Pilger – Pine, s. 165-178. W: Ralska-Jasiewiczowa M., Latałowa M., Wasylikowa K., Tobolski K. Madeyska E., Wright H.E. Jr., Turner Ch. (Red.). 2004. Late Glacial and Holocene history of vegetation in Poland based on isopollen maps. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Lewandowski A., Boratyński A., Mejnartowicz L. 2000. Allozyme investigations on the genetic differentiation between closely related pines – *Pinus sylvestris*, *P. mugo*, *P. uncinata* and *P. uliginosa* (Pinaceae). *Plant Systematics and Evolution* 221: 15-24.
- Little E. L., Critchfield W. B. 1969. Subdivision of the Genus *Pinus* (Pines). U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Misc Publ. 1144, Washington, s. 1-51.
- Łomnicki A. 2000. *Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Magri D., Vendramin G. G., Comps B., Dupanloup I., Geburek T., Gömöry D., Latałowa M., Paule L., Roure J. M., Tantau I., Knaap W. O. van der, Petit R. J., Beaulieu J. Ld. 2006. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171: 199-221.
- Manni F, Guerard E, Heyer E. 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum. Biol.* 76:173-190.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.

- Marcet E. 1967. Über den Nachweis spontaner Hybriden von *Pinus mugo* Turra und *Pinus sylvestris* L. auf Grund von Nadelmerkmalen. Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft 77: 314-361.
- Marcysiak K. 2003. Pozycja taksonomiczna *Pinus uncinata* Ramond Ex DC. in Lam. & DC. na podstawie cech szyszek (praca doktorska); Bydgoszcz.
- Marcysiak K. 2005. Taxonomic position of *Pinus sylvestris* L. population from Sierra de Baza in Spain on the basis of cone characters. w: W. Prus-Głowacki (Red.), Variability and Evolution – New Perspectives. Wyd. Naukowe UAM, Poznań, Seria Biologia nr 72: 391-398.
- Marcysiak K. 2006. Scots pine (*Pinaceae*) from the Crimea compared to the species variation in Europe on the basis of cone traits. Phytologia Balcanica 12 (2): 203-208.
- Marcysiak K., Boratyński A. 2007. Contribution to the taxonomy of *Pinus uncinata* (*Pinaceae*) based on cone characters. Pl. Syst. Evol. 264: 57-73.
- Marth G. T., Czabarka E., Murvai J., Sherry S. T. 2004. The Allele Frequency Spectrum in Genome-Wide Human Variation Data Reveals Signals of Differential Demographic History in Three Large World Populations. Genetics 166: 351-372.
- Martínez García F., Montero G. 2000. Typology of *Pinus sylvestris* L. forests in Spain, Investigación Agraria, Sistemas y recursos forestales 1 (Fuera de Serie), s. 41-65.
- Médail F., Diadema K. 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. Journal of Biogeography 36: 1333-1345.
- Mejnartowicz L. 1972. Badania zmienności populacji *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. w Polsce. Arboretum Kórnickie 17: 43-120.
- Mejnartowicz L. 1979. Genetic variation in some isoenzyme loci in Scots pine (*Pinus sylvestris*) populations. Arboretum Kórnickie 24: 91-104.
- Mejnartowicz L. 1993. Genetyka biochemiczna. W: Białobok S., Boratyński A., Bugała W (Red). Biologia sosny zwyczajnej, ss. 305-324. Polska Akademia Nauk Instytut Dendrologii, Kórnik.
- Meusel H., Jäger E., Weinert E. 1965. Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. 1, Fischer Verlag, Jena.
- Mirov N. T. 1967. The Genus *Pinus*. Roland, New York.
- Moczko J. A., Bręborowicz G. H., Tadeusiewicz R. 1998. Statystyka w badaniach medycznych. Springer PWN, Warszawa, s. 1-128.
- Mojski J. E. 1993. Europa w plejstocenie, ewolucja środowiska przyrodniczego. Wydawnictwo PAE, Warszawa.
- Molotkov P. T., Patlaj I.N. 1991. Systematic position within the genus and intraspecific taxonomy. W: Giertych M., Mátyás C. (Red.), Genetics of Scots Pine, s. 31-40. Akademiai Kiadó, Budapest.
- Montserrat P. 1976. Clima y paisaje. Pub. Cent. Pir. Biol. Exp. 7(1): 149-171.
- Muchewicz E. 2007. Zróżnicowanie sosny hakowatej *Pinus uncinata* Ramond (*Pinaceae*) w granicach zasięgu naturalnego. Rozprawa doktorska. Kórnik.
- Müller C. U., Pross J., Bibus E. 2003. Vegetation response to rapid climate change in Central Europe during the past 140,000 yr based on evidence from the Füraamoos pollen record. Quaternary Research 59: 235-245.

- Musil I. 1977. Variabilita znaků jedlic u kompletu *Pinus mugo* a u *Pinus sylvestris*. *Preslia* 49: 23-32.
- 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 (12): 1226-1245.
- Naydenov K., Senneville S., Beaulieu J., Tremblay F., Bousquet J. 2007. Glacial vicariance in Eurasia: mitochondria 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.
- Neet-Sarqueda C. 1994. Genetic differentiation of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus mugo* agr. populations in Switzerland. *Silvae Genetica* 43: 207-215.
- Nei M., Maruyama T., Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.
- Obminski Z. 1970. *Zarys ekologii*. W: Białobok S. (Red.), *Sosna zwyczajna, Nasze drzewa leśne* PWN, Warszawa-Poznań.1: 152-231.
- Oktaba W. 1986. *Metody statystyki matematycznej w doświadczałnictwie*. PWN, Warszawa.
- Pardo F., Gil L. 2005. The impact of traditional land use on woodlands: a case study in the Spanish Central System. *Journal of Historical Geography* 31 (3): 390-408.
- Pardos J. A., Lange W., Weißmann G. 1990. Morphological and Chemical Aspects of *Pinus sylvestris* L. from Spain. *Holzforschung - International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*. 44 (2): 143-146.
- Pashkevich N. 2005. Phenotypical variability pine-needle of species of the genus *Pinus* L. in Ukrain. *Ukrainian Botanical Journal* 5: 657-665.
- Patlaj I. N. 1984. Issledovanie anatomičeskogo stroeniâ chvoi sosny obyknovennoj različnyh klimatipov. *Lesovodstvo i Agrolesomelioraciâ* 69: 44-48.
- Pawlaczyk E. M., Bobowicz M. A., Korczyk A. F. 2010. Zmienność trzech naturalnych populacji *Pinus sylvestris* L. z różnych siedlisk Puszczy Białowieskiej oszacowana cechami igieł. *Leśne Prace Badawcze* 71 (1): 83-92.
- 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.
- Peñalba M. C., Arnold M., Guiot J., Duplessy J. C., de Beaulieu J. L. 1997. Termination of the Las Glaciacion in the Iberian Peninsula inferred from the pollen sequence of Quintanar de la Sierra. *Quaternary Research* 48: 205-214.
- Pereira Coutinho A.X. 1974. *Flora de Portugal*. Verlag von J. Cramer, 3301 Lehre, Wheldon & Wesley, Ltd, Stechert-Hafner Service Agency, Inc. Codicote, Herts. New York, s. 54-55.
- Pérez-Obiol R., Julia R. 1994. Climatic change in the Iberian Peninsula recorded in a 30000-yr pollen record from Lake Banyoles. *Quaternary Research* 41: 91-98.
- Petit R. J., Aguinalde I., de Beaulieu J. L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Müller-Starck G., Demesure-Musch B., Palmé A., Martín J. P., Rendell S., Vendramin G.G. 2003. Glacial Refugia: Hotspots But Not Melting Pots of Genetic Diversity. *Science* 300 (5625): 1563-1565.

- Petit R. J., Brewer S., Bordács S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csaikl U.M., Dam B. C. van, Deans J.D., Espinel S., Fineschi S., Finkeldey R., Glaz I., Goicoechea P. G., Jensen J. S., König A.O., Lowe A. J., Madsen S. F., Mátyás G., Munro R. C., Popescu F., Slade D., Tabbener H., Vrie, S. G. M. de, Ziegenhagen B., Beaulieu J. L. de, Kremer A. 2002 a. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence, *Forest Ecology and Management* 156 (1-3): 49-74.
- Petit R. J., Csaikl U. M., Bordács S., Burg K., Coart E., Cottrell J., van Dam B., Deans J. D., Dumolin-Lapégue S., Fineschi S., Finkeldey R., Gillies A., Glaz I., Goicoechea P. G., Jensen J. S., König A. O., Lowe A. J., Madsen S. F., Mátyás G., Munro R. C., Olalde M., Pemonge M. H., Popescu F., Slade D., Tabbener H., Turchini D., de Vries S. G. M., Ziegenhagen B., Kremer A. 2002 b. Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5-26.
- Petit R. J., Wagner D. B., Kremer A. 1993. Ribosomal DNA and chloroplast DNA polymorphisms in a mixed stand of *Quercus robur* and *Q. petraea*. *Annals of Forest Science* 50 (1): 41-47.
- Pilger R. 1926. *Gymnospermae*. W: Engler A. i Prantl K. (Red.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. 2. Aufl. 13, Leipzig - Berlin.
- Polakov P. P., Pavlov I. V. (1956): *Pinus* L. W: Pavlov I. V. (Red.), *Flora Kazachskoj SSSR* 1: 68 – 70. AN Kazachskoj SSR, Alma – Ata.
- Pravdin L. F. 1964. *Sosna obyknovennaja*. *Izmenčivost vnutrividovaja sistematika i selekcija*. Nauka, Moskwa.
- Price, R. A., A. Liston, and S. H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. Ss. 49-68 W: Richardson, D.M. (Red.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press.
- Provan J., Soranzo N., Wilson N. J., Goldstein D. B., Powell W. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153: 943-947.
- Provan J., Soranzo N., Wilson N. J., Mcnicol 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 the Royal Society of London, Biological Sciences* 265: 1697-1705.
- Prus-Głowacki W., Stephan B. R. 1994. Genetic Variation of *Pinus sylvestris* from Spain in Relation to Other European Populations. *Silvae Genetica* 43: 7-14.
- Prus-Głowacki W., Stephan B. R., Bujas E., Alia R., Marciniak A. 2003. Genetic differentiation of autochthonous populations of *Pinus sylvestris* (Pinaceae) from the Iberian peninsula. *Plant Systematics and Evolution* 239: 55-66.
- Przybylski T. 1972. Variability of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) of polish provenances. *Arboretum Kórnickie* 17: 121-167.
- Przybylski T. 1993. Ekologia. W Białobok S., Boratyński A., Bugała W (Red). *Biologia sosny zwyczajnej*. Ss. 255-281. Polska Akademia Nauk Instytut Dendrologii, Kórnik.
- Pyhäjärvi T., García-Gil M. R., Knürr T., Mikkonen M., Wachowiak W., Savolinen O. 2007 a. Demographic History Has Influenced nucleotide Diversity In European *Pinus sylvestris* Populations. *Genetics* 177: 1713-1724.

- Pyhäjärvi T., Salmela M. J., Savolinen O. 2007 b. Colonization routes of *Pinus sylvestris* inferred from distribution of mitochondrial DNA variation. *Tree Genetics & Genomes* 4 (2): 247-254.
- Ralska-Jasiewiczowa M., Latałowa M., Wasylkowa K., Tobolski K., Madeyska E., Wright H. E. Jr., Turner Ch. (Red.), 2004. Late Glacial and Holocene history of vegetation in Poland based on isopollen maps. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Richardson D. E. (Red.), 1998. Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press, ss. 527.
- Robledo-Arnuncio J. J., Collada C., Aliá R., Gil L. 2005. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *Journal of Biogeography* 32: 595-605.
- Rožanova M. A. 1946. Eksperimental'nye osnovy sistematiki rastenij. Izd. AN SSSR, Moskwa.
- Ruby J. L., Wright J. W. 1976. Revised Classification of Geographic Varieties in Scots Pine. *Silvae Genetica* 25: 169-175.
- Scafli 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.
- Scaltsoyiannes A., Tsaktsira M., Pasagiannis G., Tsoulpha P., Zhelev P., Iliev I., Rohr R. 2009. Allozyme variation of European Black (*Pinus nigra* Arnold) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations and implications on their evolution: A comparative study. *Journal of Biological Research* 11: 95-106.
- Semiz G., Heijari J., Isik K., Holopainen J. K. 2007. Variation in Needles terpenoids among *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) provenances from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 652-661.
- Seneta W. 1981. Drzewa i krzewy iglaste. PWN, Warszawa.
- Shaw G. R. 1914. The genus *Pinus*. Cambridge, Publication of the Arnold Arboretum 5.
- Sheue C. R., Yang Y. P., Kuo-Huang L. L. 2003. Altitudinal variation of resin ducts in *Pinus taiwanensis* Hayata (Pinaceae) needles. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 305-313.
- Sinclair W. T., Morman J. D., Ennos R. A. 1999. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 8: 83-88.
- Sobierajska K., Boratyńska K. 2008. Variability of needle characters of *Pinus mugo* Turra populations in the Karkonosze Mountains in Poland. *Dendrobiology* 59: 41-49.
- Sokal R. R., Rohlf F. J. 2003. Biometry. The principles and Practice of Statistics in Biological Research. Third Edition. W. H. Freeman and Co., New York.
- Sokolov I. A. 1928. K voprosu o geografičeskich rasach *Pinus sylvestris* L. *Izvestiâ glavnoĝo botaničeskogo sada*: 559-586.
- Sokolov S. Ja., Svazeva O. A., Kubly V. A. 1977. Arealy derev'ev i kustarnikov SSSR. 1. Nauka, Leningrad.
- Sokołowski S. 1931. Prace biometryczne nad rasami sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na ziemiach Polski. *Prace Rolniczo-Leśne* 5.

- 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.
- Soto A., Robledo-Arnuncio J. J., González-Martínez S. C., Smouse P. E., Alía R. 2010. Climatic niche and neutral genetic diversity of the six Iberian pine species: a retrospective and prospective view. *Molecular Ecology* 19: 1346-1409.
- Staszkiwicz J. 1961. Zmienność współczesnych i kopalnych szyszek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) – Variation in recent and fossil cones of *Pinus sylvestris* L. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 7 (1): 97-160.
- Staszkiwicz J. 1963. Recherches biométriques sur la variabilité des cônes du Pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) du Massif central en France – Badania biometryczne nad zmiennością sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w Masywie Centralnym we Francji. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 9 (2): 175-187.
- Staszkiwicz J. 1968. Badania nad sosną zwyczajną z Europy południowo-wschodniej i Kaukazu oraz jej stosunkiem do sosny z innych obszarów Europy, oparte na zmienności morfologicznej szyszek. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 14 (3): 259-314.
- Staszkiwicz J. 1970. Systematyka i zmienność. W: Białobok S. (Red.), Sosna zwyczajna *Pinus sylvestris* L. Nasze Drzewa Leśne 1: 55-77. PWN, Warszawa – Poznań.
- Staszkiwicz J. 1993. Zmienność morfologiczna szpilek, szyszek i nasion. W Białobok S., Boratyński A., Bugała W (Red). *Biologia sosny zwyczajnej*. Ss. 33-43. Polska Akademia Nauk Instytut Dendrologii, Kórnik.
- Staszkiwicz J., Tyszkiewicz M. 1969. Les hybrides naturels de *Pinus mugo* Turra et *Pinus sylvestris* L. Dans le bassin de Nowy Targ. *Bulletin de L'Académie Polonaise des Sciences* 17 (9): 597-584.
- Staszkiwicz J., Tyszkiewicz M. 1976. Zmienność populacyjna i osobnicza szyszek kosodrzewiny (*Pinus mugo* Turra) ze szczególnym uwzględnieniem materiałów z Karpat – Population and Individual of Cones of Dwarf Mountain Pine (*Pinus mugo* Turra) with Special Regard to Materials from Carpathians. *Fragmenta Floristica Et Geobotanica* 22 (1-2): 19-29.
- Stebbins G.L. 1958. Zmienność i ewolucja roślin. PWN, Warszawa.
- Stern K., Roche L. 1974. *Genetics of Forest Ecosystems*. Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, ss. 332.
- Steven H. M., Carlisle A. 1959. *The native pinewoods of Scotland*. Oliver and Boyd, Edinburg, London.
- Svendsen J. I., Astakhov V. I., Bolshiyano, D. Yu., Demidov I., Dowdeswell J. A., Gataullin V., Hjort C., Hubberten H. W., Larsen E., Mangerud J., Melles M., Möller P., Saarnisto M., Siegert M. J. 1999. Maximum extent of the Eurasian ice sheets in the Barents and Kara Sea region during the Weichselian. *Boreas* 28: 234–242.
- Svoboda A. M. 1971. Contribution aux recherches sur variabilité des cônes du Pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.), et sur son extension en Mongolie. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 17 (3): 367-374.
- Svoboda P. 1953. *Lesní dřeviny a jejich porosty*, 1. Statní Zemed. Naklad., Praha.
- Szweykowski J. 1969. The variability of *Pinus mugo* Turra in Poland. *Sér. D, Sci. Biol.*

- Szweykowski J., Bobowicz A. M. 1977. Variability of *Pinus mugo* Turra in Poland IV. Needles and cones in some polish populations. Bulletin de Société Amis des Sciences et des Lettres, Poznań, Série D, Sciences Biologiques 10: 37-54.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G., Cosson J. F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Molecular Ecology 7: 453-464.
- Taylor T. N., Taylor E. L., Krings M. 2009. Paleobotany. The Biology and Evolution of Fossil Plants. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.
- Tenaillon M. I., U'Ren J., Tenaillon O., Gaut B. S. 2004. Selection Versus Demography: A Multilocus Investigation of the Domestication Process in Maize. Molecular Biology and Evolution 21 (7): 1214-1225.
- Tobolski J. J., Hanover J. W. 1971. Genetic Variation in the Monoterpenes of Scotch Pine. Forest Science 17: 293-299.
- T kin N. T. 1974. Izmen ivost' priznakov chvoi sosny obyknovennoj. Lesnoechoz jstvo 8: 39-42.
- Turna I., G ney D. 2009. Altitudinal variation of some morphological characters of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Turkey. African Journal of Biotechnology 8 (2): 202-208.
- Urbaniak L. 1998. Zr znicowanie geograficzne sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z terenu Eurazji na podstawie cech anatomicznych i morfologicznych igieł. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
- Urbaniak L., Chudzińska E., Faferek S. 2008. Differentiation of *Pinus sylvestris* populations of the Tatra Mts and the Tuchola forest expressed in the needle anatomical traits. Dendrobiology, vol. 60: 35-43.
- Urbaniak L., Gařiorowska E., Klasa A. 2006. Próba wytypowania reliktowych populacji sosny zwyczajnej na terenie Ojcowskiego Parku Narodowego. Pradnik, Prace Muz. Szafera, 16: 119-124.
- Urbaniak L., Karliński L., Popielarz R. 2003. Variation of morphological needles characters of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in different habitats. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 72 (1): 37-44.
- Urbaniak L., Przybyła M., Chudzińska E., Zieliński R., Polok K. 2009. Needle anatomy suggests hybridization between the relict *turfosa* form of *Pinus sylvestris* L. from the Gazwa peat bog and typical Scots pine. Acta Soc. Bot. Pol. 78 (1): 29-36.
- Urbaniak L., Vončina G. 2008. Charakterystyka sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. z Sokolicy, Kazalnicy i Czertezika w cechach morfologicznych igieł. Pieniny – Przyroda i Człowiek 10: 19-26.
- Vidâkin A. N. 1981. Izmen ivost' anato-morfologo eskogo stroeni  chvoi v geografi eskich kul'turach Kirovskoj oblasti. Lesoved. 5: 18-25.
- Vidakovi  M. 1991. Conifers morphology and variation. Grafi ki Zavod Hrvatske.
- Vigo i Bonada J. 1983. El poblement vegetal de la Vall de Ribes. Acta Botanica Barcinonensis 35: 1-793.
- Villar L., Sesé J. A., Ferrández J. V. 1997. Atlas de la Flora del Pirineo Aragon s I. Introducción. Lycopodiaceae – Umbelliferae. Editado por el Instituto de Estudios Altoaragoneses y el Consejo de Protección de la Naturaleza en Aragón con la

colaboración del Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC) y el Departamento de Medio Ambiente del Gobierno de Aragón.

- Wang, X. R., Tsumura Y., Yoshimaru H., Nagasaka K., A. E. Szmidt. 1999. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequences. *American Journal of Botany* 86: 1742-1753.
- Watała C. 2002. Biostatystyka – wykorzystanie metod statystycznych w pracy badawczej w naukach biologicznych. α -medica Press, Bielsko-Biała.
- Welten M., Sutter R. H. C. 1982. Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen der Schweiz. 1. Birkhäuser, Basel.
- Willis K. J., Bennet K. D., Birks J. B. 1998. The late Quaternary dynamics of Pine in Europe. W: Richardson, D.M. (Red.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press.
- Willis K. J., van Andel T. H. 2004. Trees or no trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews* 23: 2369-2387.
- Willkomm M., Lange J. 1870. *Prodromus Florae Hispanicae*, 2. Schweizerbarth, Stuttgartiae, s. 680.
- Willyard A, Cronn R, Liston A. 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. *Mol Phylogenet Evol.* 52 (2): 498-511.
- Wołek J. 1992. *Vademecum statystyki dla biologów*. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Kraków.
- Wu Ch.-L. 1956. The taxonomic revision and phyto-geographical study of Chinese pines. *Acta Phytotax. Sinica* 5: 131-164.
- Wulf E. W. 1927. *Flora Kryma*. Tom I. Wypusk I. Gosud. Nik. Bot. Sad. Moskwa.
- Yaman B. 2007. Comparative wood anatomy of *Pinus sylvestris* and its var. *compacta* in the West Black Sea region of Turkey. *IAWA Journal* 28 (1): 75-81.
- Zabłocki J. 1928. Tertiäre Flora des Salzlagers von Wieliczka. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 5 (2): 174-208.
- Zajączkowski M. 1936. O południowej granicy zasięgu sosny pospolitej w Polsce i występowaniu sosny reliktovej w Karpatach polskich. *Prace Rolniczo – Leśne PAU* 20.
- Zajączkowski M. 1949. Studia nad sosną zwyczajną w Tatrach i Pieninach. *Prace Rolniczo – Leśne PAU* 45.
- Zar J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, New Jersey.
- Żelawski W., Gowin T. 1967 O rozmieszczeniu aparatów szparkowych na powierzchni igieł sosny pospolitej (*Pinus sylvestris* L.). *Folia Forestalia Polonica Seria A*, zeszyt 13: 111-117.