

Identyfikacja genetyczna i morfologiczna taksonów rodzaju *Sorbus* subpopulacji rodzimej, mieszańcowej i obcej dla flory Tatrzańskiego Parku Narodowego



**Dofinansowano ze środków funduszu leśnego przekazanych przez
Lasy Państwowe**

Tatrzańskiemu Parkowi Narodowemu w 2019 roku

Zespół autorski:

Anna Hebda¹, Marta Kempf², Witold Wachowiak³

- ¹⁾ Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biotechnologii Roślin
- ²⁾ Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, Wydział Leśny, Katedra Ekologii i Hodowli Lasu
- ³⁾ Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Instytut Biologii Środowiska

Kraków, listopad 2019

Spis treści:

- 1. Wstęp i cel pracy**
- 2. Materiały i metody**
 - 2.1. Materiał badawczy**
 - 2.2. Analizy genetyczne przy wykorzystaniu markerów mikrosatelitarnych**
 - 2.3. Analizy morfologiczne aparatu asymilacyjnego**
- 3. Wyniki**
 - 3.1. Identyfikacja genetyczna badanych taksonów rodzaju *Sorbus***
 - 3.2. Identyfikacja morfologiczna badanych taksonów rodzaju *Sorbus***
- 4. Podsumowanie i wnioski**
- 5. Spis tabel i rycin**
- 6. Literatura**

1. Wstęp i cel

Zmienność genetyczna kształtowana jest przez szereg czynników związanych m.in. ze specyfiką gatunku odnoszącą się do wielkości tworzących je populacji, systemów kojarzenia, możliwości krzyżowania się z innymi gatunkami, selekcją naturalną, czy też przepływem genów. Procesy zachodzące pomiędzy gatunkami związane z poliploidyzacją i hybrydyzacją mogą mieć dwojaki skutek. Po pierwsze mogą prowadzić do zwiększenia poziomu zmienności w obrębie danych populacji lub całego gatunku. Mogą stanowić również strategię dostosowywania się do zmieniających warunków środowiskowych. Z drugiej strony, z punktu widzenia zachowania czystości gatunkowej, krzyżowanie się osobników różnych gatunków może być zjawiskiem niepokojącym i stanowić zagrożenie dla naturalnego charakteru zbiorowisk, cennych przyrodniczo i unikatowych obszarów chronionych. Dla gatunków drzewiastych rola poliploidyzacji i hybrydyzacji jest istotnie związana z kształtowaniem bioróżnorodności całych ekosystemów. Procesy te są kluczowe w zrozumieniu zmian ewolucyjnych oraz rozwoju naturalnych ekosystemów roślin (Dickinson et al. 2007).

Rodzaj *Sorbus* jest przykładem dużej złożoności taksonomicznej i specjacji wynikającej z połączonych efektów hybrydyzacji, poliploidyzacji i apomiksji. Obejmuje około 80 form diploidalnych i dwa razy tyle taksonów pochodzenia mieszańcowego rozpowszechnionych w umiarkowanej strefie półkuli północnej. Wśród jego europejskich gatunków jedynie pięć jest diploidalnych i charakteryzuje się relatywnie szerokim zasięgiem. Są to *Sorbus aucuparia* L., *S. domestica* L., *S. torminalis* (L.) Crantz, *S. chamaemespilus* (L.) Crantz i *S. aria* (L.) Crantz. Trzy ostatnie stanowią główne źródło wielu form mieszańcowych – taksonów endemicznych i stenobiotycznych (Gömöry, Krajmerová 2008). W zachodnich Karpatach opisano w randze podgatunku hybrydy pochodzące najprawdopodobniej ze zmieszania *S. chamaemespilus* (L.) Crantz i *S. aria* (L.) Crantz (Gömöry, Krajmerová. 2008). Oba te gatunki występują również w polskich Karpatach, gdzie naturalne stanowiska *Sorbus aria* (L.) Crantz – jarzębu mącznego zlokalizowane są w reglu dolnym Tatr i w Pieninach, a kilka stanowisk jarzębu niespułkowgo - *S. chamaemespilus* (L.) Crantz odnaleziono w Tatrach.

W Polsce do najliczniej występujących gatunków rodzaju *Sorbus* zalicza się m. in. *Sorbus intermedia* zwany jarzębem szwedzkim, pochodzenia hybrydowego, który wywodzi się od *Sorbus aria*, *S. aucuparia* i *S. torminalis* (Jankun 1993). Jarząb szwedzki naturalnie pochodzi z północno-wschodniej Europy, ale promowany przez wiele dekad, jako gatunek ozdobny, zajmuje obecnie wiele stanowisk również w innych częściach Europy. W Polsce

przebiega południowa granica zasięgu jego występowania, z pojedynczymi stanowiskami rozproszonymi między Kołobrzegiem, a Gdańskiem. Zanikanie populacji jarzębu szwedzkiego doprowadziło do konieczności wprowadzenia prawnej ochrony tego gatunku. Nieliczne stanowiska jarzębu szwedzkiego występują również w lasach tatrzańskich, gdzie był wprowadzany sztucznie lub pojawił się w efekcie ornitochorii z osobników stanowiących nasadzenia miejskie w Zakopanem.

Dawne doniesienia literaturowe wskazują na udział gatunku *Sorbus intermedia* lub *S. austriaca* wraz z *S. aria* w powstaniu formy mieszańcowej zwanej *Sorbus carpatica*. Jarząb ten występujący jedynie w Karpatach na znacznych wysokościach (Giżycki 1845), może być taksonem endemicznym pochodzenia hybrydowego. Obecnie prawdopodobne mieszańce spotykane są pojedynczo lub w niewielkich grupach blisko naturalnych stanowisk *S. aria* lub *S. aucuparia* na obszarze całego Tatrzańskiego Parku Narodowego. Określane są, jako forma pośrednia wykazująca cechy morfologiczne (p.w. kształt liści) charakterystyczne dla obu form rodzicielskich (Pawłowska, Pawłowski 1970). *Sorbus carpatica* BORBÁS charakteryzowany jest, jako hybryda stanowiący związek morfologiczny między *S. aria* i *S. intermedia* (Kovanda 1996). Jego geograficzne rozmieszczenie ogranicza się do obszaru Karpat i wg cytowanego autora również Półwyspu Bałkańskiego (Kärpäti 1960). Pojedyncze lokalizacje odnajdywano w Austrii (Kärpäti 1960, Kutzelnigg 1994) i w Czechach, gdzie jego osobniki występowały w otwartych częściach lasów i w zaroślach razem z *S. intermedia* i *S. aria*. Jävorka (1915) traktowała *Sorbus carpatica* BORBÁS jako niehybrydową formę przejściową pomiędzy *S. aria* i *S. intermedia*. Klika (1937) z kolei uważał, że *S. carpatica* jest jedynie marginalną formą z zasięgu brzegowego *S. intermedia* lub wg. Soö (1937) - zróżnicowaną formą *S. aria*. Jednakże wszystkie powyższe charakterystyki oparte były jedynie na obserwacjach morfologicznych bez identyfikacji genetycznej potencjalnych form hybrydowych.

Obecnie zaawansowane techniki biologii molekularnej i genomiki umożliwiają szczegółową analizę zmienności i zróżnicowania genetycznego populacji, przepływu genów, hybrydyzacji oraz wielu innych procesów kształtujących poziom zmienności genetycznej. Możliwość identyfikacji zasobów genowych poszczególnych populacji jest podstawą do podejmowania świadomych decyzji w aspekcie zachowania zasobów genowych oraz efektywnej ich ochrony. Jest to szczególnie ważne w obszarach cennych przyrodniczo, takich jak na przykład Tatry, które swą wyjątkowość zawdzięczają geomorfologicznej i klimatycznej odrębności, co bezpośrednio wpływa na kształtowanie tam unikatowych ekotypów, siedlisk, czy też całych formacji roślinnych.

Celem niniejszych badań było:

1. poznanie zmienności i struktury genetycznej *Sorbus aria* L. Crantz z Tatrzańskiego Parku Narodowego, identyfikacja sposobów jego rozmnażania i tworzenia mieszańców międzygatunkowych;
2. sprawdzenie, czy osobniki *Sorbus intermedia* (Ehrh.) Pers. stanowiący gatunek obcy, introdukowany na tereny TPN, biorą udział w hybrydyzacji;
3. weryfikacja historycznych doniesień występowania na terenie TPN osobników zidentyfikowanych, jako forma mieszańcowa: *Sorbus carpatica*.

Do analizy genetycznej wykorzystano zmienność krótkich sekwencji powtórzeniowych tzw. mikrosatelitarnego DNA występujących w niekodującej części genomu jądrowego i chloroplastowego. Zastosowanie aplikacyjne tych markerów udowodnione było w wielu pracach (np. Robertson et al. 2010). Badania uzupełniono analizami zmienności aparatu asymilacyjnego w celu sprawdzenia, czy cechy morfologiczne liści pozwalają na poprawne przyporządkowanie osobników do testowanych gatunków rodzaju *Sorbus*.

Przetestowano następujące hipotezy badawcze:

H1 – Badane populacje *Sorbus aria* i *Sorbus intermedia* charakteryzują się występowaniem wspólnych alleli w obrębie poszczególnych loci, co może być wynikiem hybrydyzacji i wytworzenia płodnej formy mieszańcowej *Sorbus carpatica*;

H2 – Analizowane osobniki wykazują zróżnicowanie cech morfologicznych pozwalające na jednoznaczne sklasyfikowanie ich do odrębnych taksonów.

2. Materiał i metody

2.1 Materiał badawczy

Do analiz genetycznych i morfologicznych pobrano próbki w postaci ulistnionych pędów o długości ok. 15 cm z 73 osobników z rodzaju *Sorbus* z Tatrzańskiego Parku Narodowego. Dodatkowa próbka (1 sztuka) w stosunku do planu stanowiła zapas i została zebrana w ramach działalności naukowo-badawczej TPN. Na podstawie identyfikacji morfologicznej gatunków materiał zebrano z 30 drzew rozpoznanych, jako *Sorbus intermedia* (Ehrh.), z 23 drzew *Sorbus aria* L. Crantz, oraz z 20 osobników *S. carpatica* – zebranych z obszaru, gdzie potencjalnie mogłyby występować formy mieszańcowe. Do *Sorbus carpatica* zaliczono osobniki, które wykazywały cechy charakterystyczne dla różnych gatunków *Sorbus* lub też

osobniki zidentyfikowane jako *S. intermedia*, ale występujące w dalekiej odległości od potencjalnego źródła nasion, a w bliskim sąsiedztwie naturalnych stanowisk *S. aria*.

Analizy genetyczne

Materiał do analizy zmienności i zróżnicowania genetycznego metodą markerów mikrosatelitarnych stanowił pojedynczy liść reprezentujący poszczególnego osobnika (łącznie 73 liście - próby). Liście wysuszono, a następnie roztarto w ciekłym azocie, w celu uzyskania sproszkowanej próbki materiału roślinnego, która posłużyła do izolacji genomowego DNA. Około 200 mg materiału wykorzystano do izolacji DNA z zastosowaniem komercyjnego kitu Genomic Midi AX Plant (A&A). Wydajność ekstrakcji sprawdzono poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym wybarwionym Midori Green (Nippon Genetics Europe). Wyizolowane próbki DNA sprawdzano pod kątem ilościowym i jakościowym z zastosowaniem urządzenia NanoDrop Life (Thermo Scientific). Do analizy długości fragmentów mikrosatelitarnych przygotowano próbki z zawartością ok. 10 ng DNA na 1 μ l mieszaniny.

Analizy morfologiczne

Materiał do analiz morfologicznych stanowiły liście, które z każdego osobnika pobierane były zazwyczaj z krótkopędów, ze środkowej części korony, a następnie suszone (Widder 1970). Dla 30 osobników *S. intermedia* pobrano średnio po 23 liście z drzewa, dla 23 osobników *S. aria* średnio po 19 liści, a z 20 osobników *S. carpatica* pobrano średnio po 17 liści na drzewo.

Do analiz morfologicznych wykorzystano te same drzewa co do analiz genetycznych za wyjątkiem 1 osobnika *S. intermedia*, 7 osobników *S. aria* i 4 osobników *S. carpatica*, ze względu na zbyt małą ilość materiału asymilacyjnego. Informacje na temat lokalizacji osobników *Sorbus*, wielkości próby oraz zastosowanych metod przedstawia tabela 1, a rycina 1 ich położenie geograficzne.

2.2 Analizy genetyczne przy wykorzystaniu markerów mikrosatelitarnych

Badania zmienności genetycznej jarzębów przeprowadzono za pomocą 17 markerów mikrosatelitarnych jądrowego DNA (nSSR – nuclear Simple Sequence Repeat) i 1 chloroplastowego DNA (cpSSR) dostępnych w literaturze (González-González et al. 2010, Kamm et al. 2009, Oxelman et al. 1997) (Tabela 2). Zaplanowano przeprowadzenie reakcji amplifikacji w 4 multipleksach, pozwalających na równoczesną analizę polimorfizmu

długości kilku loci w jednej reakcji PCR (Tabela 2). Reakcję multiplex PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) przeprowadzono przy użyciu mieszaniny reakcyjnej o całkowitej objętości 10 μ l zawierającej około 10 ng DNA, 5 μ l Multiplex PCR Kit (Qiagen) i 0,2 μ M każdego ze starterów. Reakcję przeprowadzono w następujących etapach: wstępna denaturacja 15 min w 95°C, a następnie 35 cykli: denaturacja 94°C / 30 s, annealing (przyłączanie starterów) 60°C (multiplex I, II) lub 48 °C (III) lub 55°C (IV) / 90 s, elongacja (wydłużanie starterów) 72°C - 60 s oraz w ostatnim cyklu końcowa elongacja w 60°C - 30 min.

Dla poszczególnych loci (SA03, MSS16, CH01h10, BGT23, rps16), dla których nie uzyskano produktów amplifikacji w reakcji multiplex zastosowano inną polimerazę: REDTaq ReadyMix (Sigma Aldrich) i annealing ze wzrastającą temperaturą od 55-60 °C (dla SA03, MSS16, CH01h10), 48-50°C (dla BGT23), 48-58°C (dla rps16).

Rozdział elektroforetyczny uzyskanych produktów PCR przeprowadzono na sekwenatorze kapilarnym ABI 3500, a odczyty długości alleli dla poszczególnych loci w programie GeneMapper.

Uzyskane dane o zmienności allelicznej badanych fragmentów DNA wykorzystano do testowania postawionej hipotezy badawczej w szeregu analiz genetycznych zmierzających do określenia zróżnicowania genetycznego badanych prób oraz identyfikacji osobników potencjalnie hybrydowych. Obliczenia parametrów genetycznych przeprowadzono z wykorzystaniem programu R i pakietu poppr (Kamvar et al. 2014.).

2.3 Analizy morfologiczne aparatu asymilacyjnego

Analizie morfometrycznej poddano dziesięć cech metrycznych (Rycina 2) oraz trzy parametry obliczone z uzyskanych pomiarów: powierzchnia blaszki liścia (LA - leaf area, [cm²]), obwód blaszki liścia (LP – leaf perimeter, [cm]), długość blaszki liścia (LL - leaf length, [cm]), współczynnik kształtu (FC - form coefficient), maksymalna szerokość blaszki liścia (LW - maximum leaf width, [cm]), szerokość blaszki liścia odpowiednio na 50% i na 90% długości blaszki (odpowiednio LW1 i LW2 - leaf width, [cm]), kąt między głównym nerwem, a punktem na brzegu blaszki znajdującym się odpowiednio na 10% i 25% długości liścia (odpowiednio LA1 i LA2 - lobe angle), długość ogonka (PL - petiole length, [cm]), powierzchnia ogonka (PA - petiole area, [cm²]), maksymalna szerokość blaszki liścia/długość blaszki liścia (LW/LL) oraz długość ogonka/długość blaszki liścia (PL/LL). Parametry

morfolologiczne oszacowano z dokładnością 1 μm za pomocą programu WinFOLIA Reg 2018 (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada).

Analizowane cechy scharakteryzowano za pomocą średnich arytmetycznych (\bar{X}) i odchyłeń standardowych (σ) w arkuszu kalkulacyjnym programu Excel. Otrzymane średnie analizowanych cech znormalizowano i przedstawiono, jako różnicę od średniej w jednostkach odchylenia standardowego (JDS). Istotność różnic sprawdzono za pomocą testów nieparametrycznych. Wyniki testu Shapiro – Wilka oraz Levene’a skłoniły do wykorzystania testu ANOVA rang Kruskala – Wallisa. W celu oceny czynników grupujących wykonano analizę składowych głównych (PCA) dla danych standaryzowanych. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programów Excel 2013 i Statistica 13.3.

3. Wyniki

3.1 Identyfikacja genetyczna badanych taksonów rodzaju *Sorbus*

Spośród 17 loci mikrsatelitarnych jądrowego DNA i 1 loci chloroplastowego DNA 15 dawało produkty reakcji PCR. Jednakże, do identyfikacji taksonomicznej badanych jarzębów wybrano ostatecznie 13 loci jądrowego DNA (SA01, SA06, SA07, MSS5, SA02, SA08, CH01h01, CH01h10, MS14h03, CH02C09, SA09, SA14, SA19.1), które były polimorficzne dla większości analizowanych osobników oraz generowały powtarzalne i jednoznaczne odczyty genotypowania.

Badane loci różniły się liczbą obserwowanych alleli w zakresie od 3 do 15, ze średnią na poziomie 8,46 (Tabela 3). Locus SA06 charakteryzowało się najwyższą liczbą alleli, najwyższym parametrem zróżnicowania określonym indeksem Simpsona ($1-D = 0,869$) (Simpson 1949) oraz zróżnicowaniem wg. Nei’a ($H_{\text{exp}} = 0,874$) (Nei 1978). Z kolei locus MS14H03, które wykazywało najmniejszą liczbę alleli, cechowało się najniższymi parametrami zmienności tj. $1-D = 0,056$, $H_{\text{exp}} = 0,056$ i największym podobieństwem frekwencji alleli określanym jako Evenness, równe 0,367. Locus CH02c09, pomimo średniej liczby alleli, charakteryzował się najmniejszym podobieństwem frekwencji alleli wyrażonym wysoką wartością Evenness równą 0,850 (Tabela 3).

Analiza poliploidalności badanych loci wykazała ich zróżnicowanie względem siebie oraz względem analizowanych gatunków jarzębów (Rycina 3.). Loci SA07, CH01h10, SA02, MS14h03, SA09, SA19.1 charakteryzowały się występowaniem dwóch alleli u pojedynczego

osobnika. Natomiast pozostałe loci SA01, SA06, MSS5, SA08, CH01h01, CH02C09, SA14 wykazywały dwa allele u pojedynczych osobników *Sorbus aria* oraz 2 lub 3 allele dla testowanych osobników pozostałych taksonów.

Analizując obraz poliploidalności dla badanych loci oraz gatunków można było przypuszczać, że niektóre osobniki zostały przypisane do nieprawidłowej grupy na podstawie identyfikacji morfologicznej w terenie. Aby to udowodnić obliczono dystans genetyczny wg Bruvo (Bruvo et al. 2004) pomiędzy parami wszystkich osobników na podstawie frekwencji alleli w testowanych loci. Zaobserwowano niejednorodny poziom zróżnicowania genetycznego w zakresie od 0,000 do 0,666. Dendrogramy obrazujące dystans genetyczny, pozwoliły na wydzielenie grup odpowiadających poszczególnym gatunkom. Rycina 4 przedstawia dendrogram z przypisaniem testowanych osobników do 3 głównych grup (klastrow), wyznaczonych przez 3 badane gatunki rodzaju *Sorbus*. Niemniej bardziej szczegółowa analiza przypisania osobników do poszczególnych klastrow wskazuje na ich niejednorodność i możliwość wydzielenia dodatkowych grup ($K = 6$, Rycina 5). Oba dendrogramy (Rycina 4 i 5) prezentują bardzo jednolitą grupę *S. intermedia*, do której należą osobniki J1-10, J12-13, J19-22, J26-30 oraz osobniki C1-12, C15, C18-19, które pierwotnie przypisane były do *S. carpatica* (drzewa oznaczone kolorem niebieskim na Rycinie 4 i zielonym na Rycinie 5). Dla $K=3$, drzewa grupowane pod względem genetycznym do *S. aria* obejmowały wszystkie pierwotnie wytypowane osobniki tego gatunku (A1-23) oraz C13-14, C20 reprezentujące pierwotnie *S. carpatica* i J11 – *S. intermedia* (Rycina 4, drzewa oznaczone kolorem czerwonym). Przy analizie większej ilości klastrow ($K = 6$, Rycina 5) grupa *S. aria* dzieli się na 3 mniejsze grupy, co jest związane z ich dużym dystansem genetycznym względem siebie i dużą zmiennością. Na podstawie dendrogramów grupę *S. carpatica* tworzą drzewa: C16-17 pierwotnie przypisane do tej grupy oraz J15-18 i J23-25 pierwotnie przypisane do *S. intermedia* (Rycina 4). Przy analizie podziału badanych drzew na 6 klastrow (Rycina 5) grupa ta jest niejednorodna i dzieli się na dwie: jedną z drzewami J17-18, J23, J25, C17 oraz drugą J14-16, J24 oraz C16.

Kontynuując badanie przynależności osobników do poszczególnych taksonów rodzaju *Sorbus*, wykorzystano analizę MSN (ang. *minimum spanning networks*), która na podstawie frekwencji alleli dla wielu loci przedstawia zależności genetyczne pomiędzy osobnikami (Rycina 6.). Analiza ta zasadniczo potwierdziła wyniki zaprezentowane i omówione powyżej na dendrogramach. Sieć zależności genetycznych (Rycina 6) prezentuje grupę osobników *S. aria* (punkty koloru czerwonego) rozlokowanych przestrzennie na czterech wąskich gałęziach świadczących o najwyższym dystansie genetycznym. Osobniki C13-14, C20 i J11

rozlokowane są na tych samych gałęziach, co potwierdza ich przynależność do *S. aria*. Osobniki *S. intermedia* (J1-10, J12-13, J19-22, J26-30) stanowią grupę połączeń wraz z niektórymi pierwotnymi reprezentantami *S. carpatica* C1-12, C15, C18-19 – nieprawidłowo zakwalifikowanych na podstawie morfologicznej. Grupę osobników hybrydowych – mieszańcowych – stanowią osobniki występujące na gałęziach pomiędzy *S. aria* i *S. intermedia* – są to J14-16, J24 i C16 oraz na gałęzi oddzielającej się jedynie od *S. aria* – są to J17-18, J23, J25 i C17.

Na podstawie wyników analiz genetycznych przyporządkowano poszczególne osobniki do gatunków, które reprezentowały. Wówczas *Sorbus aria* stanowiło 27 drzew: A1-23, C13-14, C20, J11, *S. intermedia* 36 drzew: J1-10, J12-13, J19-22, J26-30, C1-12, C15, C18-19, a formę mieszańcową *S. carpatica* reprezentowało 10 drzew: C16-17, J15-18 i J23-25. Parametry zmienności genetycznej obliczone dla badanych gatunków przedstawiono w tabeli 4. Ilość drzew reprezentujących dany gatunek jarzębu wahała się od 10 do 36 osobników (N). Dla *S. aria* na 27 badanych drzew zidentyfikowano 27 różnych genotypów (MGL – frekwencja genotypów w wielu loci), co oznaczało najwyższą możliwą różnorodność genetyczną. *S. carpatica* charakteryzował się najniższą liczbą genotypów MGL = 8, przy najniższej liczbie badanych drzew. Jednakże zrównując liczbę badanych osobników na gatunek (eMLG – oczekiwana frekwencja genotypów w wielu loci) liczba oczekiwanych genotypów była najniższa dla *S. intermedia* (Tabela 4). Do scharakteryzowania zmienności genetycznej opisującej strukturę genetyczną wewnątrz populacji wykorzystano indeks Stoddarta & Taylora (1988) oznaczany jako G. Miara ta jest mniej podatna na różną wielkość analizowanej próby i mówi, której frekwencji genotypów należałoby oczekiwać dla każdego loci przy analizie wielu loci równocześnie. Oblicza się ją jako iloraz 1 przez sumę kwadratów frekwencji poszczególnych genotypów dla wielu loci. Na tej podstawie *S. aria* charakteryzował się najwyższą zmiennością genetyczną określoną na poziomie $G = 27$. Natomiast *S. intermedia* i *S. carpatica* wykazywały podobny poziom zmienności genetycznej tj. odpowiednio $G = 5,45$ i $G = 6,25$. *S. intermedia* charakteryzuje się najniższą wartością E.5 (Evenness), która może wskazywać na występowanie genotypów dominujących w obrębie gatunku. Heterozygotyczność określona wg Nei's (Nei 1978), stanowiąca oczekiwaną frekwencję genotypów dla wszystkich loci i osobników danego gatunku, była na wysokim poziomie, najwyższym dla *S. aria* i wynosiła $Hexp = 0,623$ a najniższym dla *S. intermedia*, $Hexp = 0,481$.

Wśród rodziny *Sorbus* znane są gatunki rozmnażające się płciowo poprzez zapłodnienie krzyżowe, ale również takie, które rozmnażają się przez apomiksję (czyli

z niezapłodnionych nasion) lub klonalnie z odrostów. Sposób rozmnażania w znaczący sposób wpływa na identyfikowaną zmienność genetyczną. U organizmów rozmnażających się poprzez zapłodnienie krzyżowe zmienność genetyczna jest wysoka (z parametrem bliskim 1) natomiast u organizmów rozmnażających się wegetatywnie zmienność ta jest ograniczona i niższa (z parametrem bliskim 0). Wg Ludwiga i kolegów (2013) sposób rozmnażania związany jest z poliploidalnością organizmów. Wyniki ich badań pokazały, że diploidalne gatunki *Sorbus* rozmnażają się płciowo poprzez krzyżowanie, natomiast triploidalne rozmnażają się wegetatywnie i charakteryzują się niewielką zmiennością genetyczną. Aby sprawdzić tę teorię w badanych gatunkach rodzaju *Sorbus* przeprowadzono analizę indeksu asocjacji (r_{barD})/ nierównowagi sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*). Nierównowaga sprzężeń zachodzi wtedy, gdy allele w dwóch lub więcej loci współwystępują częściej niż wynika to z przewidywań opartych na ich frekwencji. Indeks asocjacji (r_{barD}) oszacowany na podstawie otrzymanych frekwencji genotypów (MLG) dla losowo krzyżujących się populacji wynosi 0. Wszelkie istotne statystycznie odchylenia od oczekiwanego zera sugerowałyby klonalną reprodukcję. W niniejszych badaniach istotność została przetestowana na podstawie 999 permutacji. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że diploidalny *Sorbus aria* charakteryzuje się $r_{barD} = 0,0689$ i krzyżuje się losowo z innymi osobnikami. Natomiast osobniki gatunków triploidalnych tj. *Sorbus intermedia* i *S. carpathica* posiadają r_{barD} na poziomie odpowiednio -0,014 i 0,824 co wskazuje na ich klonalny sposób rozmnażania (Tabela 4).

3.2 Identyfikacja morfologiczna badanych taksonów rodzaju *Sorbus*

Największą średnią powierzchnię blaszki liścia (LA) osiągnął *Sorbus aria* – 34,09cm², dla którego rozpiętość tej cechy mieściła się w zakresie od 15,75cm² do 60,19cm². Najmniejszą średnią powierzchnię blaszki zanotowano u *Sorbus carpathica* – 22,53cm², dla którego odnotowano z kolei najmniejsze odchylenie standardowe σ – 4,03.

Sorbus intermedia charakteryzował się największym średnim obwodem blaszki liścia (LP) 38,34cm. Minimalna wartość cechy wynosiła 17,62cm, a maksymalna 51,99cm. Rozpiętość analizowanej cechy dla *S. carpathica* wynosiła od 25,94cm do 39,91cm.

Najwyższe wartości współczynnika kształtu (FC) cechowały *Sorbus aria*, gdzie wartość ta wynosiła 0,44, przy jednoczesnym najwyższym współczynniku zmienności σ – 0,082.

Największą średnią wartością długości blaszki liścia (LL) oraz maksymalną szerokością blaszki (LW) cechował się *S. aria* wynoszącymi odpowiednio: 8,55cm i 5,34cm. Minimalna wartość dla pierwszej cechy wynosiła 6,00cm, natomiast maksymalna - 11,80cm. Dla drugiej cechy zakres kształtował się na poziomie od 3,61cm do 7,67cm.

Najwyższe wartości średniej szerokości blaszki liścia na 50% (LW1) i 90% (LW2) długości blaszki zaobserwowano u *S. aria*, które wynosiły odpowiednio: 5,16cm (z minimalną wartością 3,48cm i maksymalną 7,40cm) oraz 2,28 cm (min. 1,26cm, max. 3,23cm). Największym odchyleniem standardowym LW1 charakteryzował się *Sorbus intermedia* ($\sigma - 1,05$), a dla LW2 *Sorbus aria* ($\sigma - 0,48$).

Największą wartość średniego kąta między głównym nerwem, a punktem na brzegu blaszki znajdującym się na 10% długości liścia (LA1) odnotowano u *S. carpatica* – 58,76°, gdzie minimalna wartość wynosiła 54,45°, a maksymalna – 62,65°. Największe odchylenie również odnotowano u *Sorbus aria*, z wynikiem $\sigma - 4,56$.

Analiza zmienności kąta znajdującego się na 25% długości liścia (LA2) wykazała, że najwyższymi wartościami średnimi cechował się *S. intermedia* – 47,43° z minimalną wartością cechy – 43,50° oraz maksymalną – 51,50°. Największym odchyleniem charakteryzował się *S. aria* – 3,00.

S. intermedia cechował się największą średnią długością (PL) i powierzchnią ogonka (PA), odpowiednio: 1,85cm oraz 0,20cm². Rozpiętość pierwszej cechy mieściła się w zakresie od 0,95cm do 2,57cm, natomiast drugiej – od 0,05cm² do 0,32cm². U gatunku tego odnotowano również największe odchylenie standardowe obydwu cech, wynosząco odpowiednio: 0,42 i 0,07.

Największym stosunkiem maksymalnej szerokości blaszki liścia/długości blaszki liścia (LW/LL) charakteryzował się *S. intermedia* – 0,69. Wartość odchylenia standardowego dla wszystkich trzech gatunków były bardzo niskie i zawierały się w zakresie od 0,03 do 0,05. Największy stosunek długości ogonka/długości blaszki (PL/LL) również odnotowano u *S. intermedia*. Wynosił on 0,25 z minimalną wartością cechy – 0,17 oraz maksymalną – 0,31. Największe odchylenie standardowe analizowanej cechy osiągnął *S. carpatica* z wynikiem $\sigma - 0,06$ (min. 0,14, max. 0,42).

Dane dotyczące analizowanego materiału zestawiono w tabeli 5.

Test ANOVA rang Kruskala – Wallisa wykazał, że należy odrzucić hipotezę zerową o równości wszystkich median. Dla sprawdzenia, które mediany różniły się między sobą, przeprowadzono dodatkowo test wielokrotnych porównań.

Cechą najbardziej różnicującą *S. carpatica* od *Sorbus aria* i *S. intermedia* była powierzchnia liścia (LA), maksymalna szerokość blaszki (LW) oraz szerokości blaszki liścia na 50% długości (LW1). Obwód blaszki liścia (LP), kąt między głównym nerwem, a punktem na brzegu blaszki znajdującym się na 25% długości liścia (LA2), długość ogonka (PL) oraz stosunek szerokości do długości blaszki (LW/LL) to cechy, które najbardziej odróżniały *S. intermedia* od pozostałych dwóch gatunków. *Sorbus aria* różnił się od *S. carpatica* i *S. intermedia* kątem między głównym nerwem, a punktem na brzegu blaszki znajdującym się na 10% długości liścia (LA1) i szerokością blaszki liścia na 90% jej długości (LW2).

Analiza składowych głównych (PCA) wykazała istnienie czterech czynników spełniających kryterium Kaisera, o wartościach własnych większych niż 1, które łącznie wyjaśniły 93,52% wariancji (Tabela. 6). Największy wkład w tłumaczenie obserwowanej zmienności miała pierwsza składowa, która wyjaśniała 52,85% wariancji oraz druga wyjaśniająca 19,72% wariancji.

Na rycinie 7 przedstawiono związek pomiędzy analizowanymi cechami trzech gatunków *Sorbus*, a składową pierwszą i drugą. Pierwsza składowa wykazała ujemną korelację ze wszystkimi analizowanymi cechami, oprócz kąta między głównym nerwem, a punktem na brzegu blaszki znajdującym się na 10% długości liścia (LA1). Oznacza to, że próby zlokalizowane na wykresie po prawej stronie osi X, cechowały się niskimi wartościami średnimi niemalże wszystkich analizowanych parametrów liści. Na pierwszą składową główną największy wpływ miała maksymalna szerokość blaszki liścia (LW), szerokość blaszki liścia mierzona na 50% długości blaszki (LW1), powierzchnia (LA) oraz długość blaszki liściowej (LL) oraz szerokość blaszki liścia mierzona na 90% długości blaszki (LW2). Na drugą składową wpływały cechy związane z kątem między głównym nerwem, a punktem na brzegu blaszki znajdującym się na 10% i na 90% długości liścia (LA1 i LA2) oraz stosunek szerokości do długości blaszki (LW/LL). Analiza PCA nie wykazała grupowania się osobników z poszczególnych gatunków względem analizowanych czynników.

4. Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania posłużyły do identyfikacji zmienności i zróżnicowania genetycznego gatunków rodzaju *Sorbus* subpopulacji rodzimej, mieszańcowej i obcej dla flory Tatrzańskiego Parku Narodowego. Ponadto umożliwiły weryfikację taksonomiczną gatunków *S. aria* i *S. intermedia* oraz potencjalnej ich formy mieszańcowej *Sorbus carpatica*. Kompleksowa analiza aparatu asymilacyjnego pozwoliła na wyodrębnienie kilku cech charakterystycznych, które mogą ułatwić identyfikację taksonomiczną w terenie.

Badane osobniki naturalnych subpopulacji *Sorbus aria* charakteryzowały się ogromną zmiennością genetyczną i wysokim stopniem zróżnicowania na poziomie dochodzącym do 66%. Na tej podstawie można stwierdzić, że gatunek ten podlega zróżnicowanej presji selekcyjnej i cały czas ewoluuje. Charakteryzuje się ogromnym potencjałem adaptacyjnym w tym trudnym środowisku, jakim jest obszar TPN.

Sorbus intermedia z kolei, który jest wprowadzony na tereny TPN sztucznie, charakteryzuje się ograniczoną zmiennością genetyczną i klonalnym sposobem rozmnażania. Występowanie genotypów dominujących w tym gatunku może być wynikiem działania presji selekcyjnej, faworyzującej jedynie genotypy dostosowane do środowiska, a sposób rozmnażania je stabilizuje poprzez tworzenie klonów.

Analizy genetyczne markerów mikrosatelitarnych jądrowego DNA umożliwiły prawidłowe przyporządkowanie poszczególnych drzew do gatunków oraz identyfikację form hybrydowych, które wykazały obecność alleli charakterystycznych dla obu potencjalnych form rodzicielskich. Ich powstanie jest wynikiem kontaktu między dwoma gatunkami występującymi na terenie Tatr: rodzimego jarzębu mącznego i obcego, introdukowanego jarzębu szwedzkiego. W przypadku *S. aria*, rozmnażającego się płciowo, tworzenie nowych hybryd jest promowane, w celu zwiększenia zmienności genetycznej (Ludwig et al. 2013) i tworzenia organizmów potomnych jeszcze lepiej przystosowanych do warunków środowiska. To *S. aria* ze względu na żywotny pyłek może być prawdopodobnie formą ojcowską w powstających nowych hybrydach. Utrwalenie przez formę mieszańcową wegetatywnego sposobu rozmnażania wynika z ich poliploidalności, ale również może stanowić sposób utrwalania nowych genotypów i reprodukcję izolowaną od form rodzicielskich (Ludwig et al. 2013). Podkreślenia wymaga fakt, że analiza klastrowa podzieliła tę niewielką grupę hybryd na dwie podgrupy, a w terenie również one zostały rozdzielone na te, które powstały z naturalnego odnowienia (kolor czarny, rycina 5) i te, które

prawdopodobnie są nasadzeniem sztucznym (kolor czerwony, rycina 5). Z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że nasiona *S. intermedia* służące do nasadzeń sztucznych, były zanieczyszczone formami hybrydowymi. Fakt ten stanowi uzasadnienie dużych problemów w rozpoznaniu poszczególnych gatunków i mieszańców rodzaju *Sorbus* na podstawie cech morfologicznych.

Wnioski z analizy genetycznej

- 1) Przetestowane 13 markerów mikrosatelitarnych jądrowego DNA pozwoliło na identyfikację zmienności różnych gatunków rodzaju *Sorbus*.
- 2) Osobniki *Sorbus aria* wykazały ogromną zmienność i zróżnicowanie genetyczne w testowanych loci nSSR.
- 3) Markery SA01, SA06, CH01h01, SA08, CH02c09 oraz SA14 pozwoliły rozróżnić gatunki *S. aria* i *S. intermedia* na podstawie różnej poliploidalności.
- 4) Analiza testowanych loci mikrosatelitarnych pozwoliła zaobserwować genotypy charakterystyczne dla *S. aria* i *S. intermedia*, o kombinacji alleli tych gatunków występujące u *S. carpatica*.
- 5) Zastosowane markery genetyczne są przydatne do identyfikacji taksonomicznej jarzębów. Badania pozwoliły jednoznacznie stwierdzić, że do gatunku *Sorbus aria* należą drzewa oznaczone symbolami: A1-23 oraz C13-14, C20 i J11, a do gatunku *S. intermedia* należą drzewa oznaczone symbolami: J1-10, J12-13, J19-22, J26-30 oraz C1-12, C15, C18-19.
- 6) Przeprowadzone prace badawcze pozwoliły na weryfikację postawionej hipotezy badawczej, wskazując na istnienie w populacji jarzębów z TPN osobników hybrydowych. Na podstawie analiz genetycznych można stwierdzić, że drzewa oznaczone symbolami: C16-17 oraz J15-18 i J23-25 są mieszańcami dwóch gatunków – *S. aria* i *S. intermedia*.

Wniosek z analizy morfologicznej

- 1) Na podstawie przeprowadzonych badań zmienności morfologicznej aparatu asymilacyjnego wybranych gatunków rodzaju *Sorbus*, trudno jest wskazać cechy jednoznacznie różnicujące badane taksony.

Analizy pozwoliły wyodrębnić jedynie grupy cech, które różnicowały w istotny sposób poszczególne gatunki, ale nie stanowią podstawy do jednoznacznej i bezbłędnej weryfikacji.

- *S. carpatica* charakteryzował się najmniejszą powierzchnią (LA) i szerokością

liści (LW i LW1).

- Dla *S. intermedia* charakterystyczny był największy obwód (LP), co wynika z mocno ząbkowanej blaszki liściowej. Liście tego gatunku, w porównaniu do *S. aria* i *S. intermedia*, były również bardziej owalne (LW/LL), charakteryzowały się dłuższymi ogonkami (PL) i szerszą nasadą blaszki (LA2),
- *Sorbus aria* różnił się od *S. carpatica* i *S. intermedia* kątem między głównym nerwem, a punktem na brzegu blaszki znajdującym się na 10% długości liścia (LA1) i szerokością blaszki liścia na 90% jej długości (LW2).

Spis tabel i rycin.

Tabele

Tabela 1. Lokalizacja osobników zebranych na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego przyporządkowane do gatunków na podstawie cech morfologicznych (Gatunek, Kod) i po weryfikacji genetycznej (Kod 2, Gatunek 2); X i Y - współrzędne prostokątne płaskie; Przeprowadzone analizy badawcze: MO-morfometria, SSR – analiza mikrosatelitarnych loci DNA, bz – bez zmian.

Tabela 2. Charakterystyka analizowanych markerów mikrosatelitarnych oraz badanych multipleksów w reakcji PCR

Tabela 3. Charakterystyka testowanych loci mikrosatelitarnego jądrowego DNA. Pogrubione – wartości parametrów najwyższe i najniższe dla badanych loci.

Tabela 4. Wartości parametrów zmienności i zróżnicowania genetycznego badanych rodzajów *Sorbus*.

Tabela 5. Charakterystyka cech morfologicznych aparatu asymilacyjnego *Sorbus aria*, *S. intermedia* i *S. carpatica*.

Tabela 6. Zasoby zmienności wspólnej.

Ryciny

Rycina 1 a, b, c. A) Położenie geograficzne osobników z rodzaju *Sorbus* na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego, z których pozyskano materiał do analizy zmienności genetycznej i cech morfologicznych aparatu asymilacyjnego. (Wygenerowana za pomocą ArcGIS Pro 10.2.2); B) Położenie geograficzne osobników z rodzaju *Sorbus* na terenie wschodniej części Tatrzańskiego Parku Narodowego. Numery osobników zgodnie z Kod 2 zawarty w tabeli 1; C) Położenie geograficzne osobników z rodzaju *Sorbus* na terenie zachodniej części Tatrzańskiego Parku Narodowego. Numery osobników zgodnie z Kod 2 zawarty w tabeli 1.

Rycina 2. Cechy morfologiczne aparatu asymilacyjnego poddane analizie. Opis skrótów w tekście.

Rycina 3. Obraz poliploidalności dla badanych loci oraz gatunków rodzaju *Sorbus*. Czarne kratki oznaczają dwa allele w locus, żółte – 3 allele w locus, szary kolor oznacza brak wyniku. Oś X – testowane loci, oś Y - osobniki przypisane do poszczególnych gatunków A – *S. aria*, C – *S. carpatica*, J – *S. intermedia*.

Rycina 4. Dendrogram prezentujący dystans genetyczny pomiędzy badanymi drzewami rodzaju *Sorbus*. Kolor czerwony oznacza grupę *S. aria*, kolor niebieski *S. intermedia* i kolor zielony *S. carpatica*.

Rycina 5. Dendrogram prezentujący dystans genetyczny pomiędzy badanymi drzewami rodzaju *Sorbus*. Analiza klastrów z $K = 6$, kolor niebieski, fioletowy i szary oznacza grupę *S. aria*, zielony – *S. intermedia* oraz kolor czerwony i czerwony – *S. carpatica*.

Rycina 6. Wynik analizy MNS na podstawie frekwencji genotypów.

Rycina 7. Rzut zmiennych (A) i przypadków (B) na płaszczyznę czynników.

7. Literatura

- Bruvo, R., Michiels, N. K., D'souza, T. G., and Schulenburg, H. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol. Ecol.* 13:2101-2106.
- Dickinson, Talent. 2007. Polyploidy, reproductive biology, and Rosaceae: understanding evolution and making classifications. *Plant Systematics and Evolution*, 266 (1–2): 59–78
- Giżycki. 1845. Badania w przedmiocie rzeczy przyrodzonych, w Galicyi, w Królestwie Polskiem, na Wołyniu i na Podolu. — Jabłoński, Lwów
- Gömöry, Krajmerová. 2008. Spatial structure of a natural mixed topodeme of subalpine *Sorbus* taxa, *Acta Soc. Bot. Pol* 77(4):305-311;
- González-González et al. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Sorbus aria* (Rosaceae). *Conserv. Genet. Resour* 2:341-343;
- Jankun. 1993. Znaczenie apomiksji w ewolucji rodzaju *Sorbus* (Rosaceae). *Fragm. Flor. Geobot.*, 38 (2):627–686;
- Jävorka. 1915. Kisebb megjegyzések és újabb adatok. H., HI. *Bot. Közl.* 14, 62-68, 98-109;
- Kamm U, Rotach P, Gugerli F, Siroky M, Edwards P, Holderegger R (2009). Frequent long-distance gene flow in a rare temperate forest tree (*Sorbus domestica*) at the landscape scale. *Heredity* 103: 476-482. - doi: 10.1038/hdy.2009.70
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., and Grünwald, N. J. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281..).
- Kärpäti. 1960. Die *Sorbus*-Arten Ungarns und der angrenzenden Gebiete. *Feddes Repert.* 62:71-334
- Klika. 1937. O *Sorbus cretica*, *S. aria*, *S. austriaca* a jejich mfsencfch v CSR. *Pffspeek k lesnicke dendrologii. Sbom. Cs. Akad. Zemed.* 12, 201-208;
- Kovanda. 1996. Observations on *Sorbus* in Southwest Moravia (Czech Republic) and adjacent Austria I. *Verh. Zool.-Bot. Ges. Österreich* 133:347-369;
- Kutzelnigg. 1994. *Sorbus*. In: Hegi G., *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin 3, 4/B,p.328-385;
- Ludwig et al. 2013. Breeding systems, hybridization and continuing evolution in Avon Gorge *Sorbus* *Ann. Bot.* 111:563–575
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.

Oxelman, B., Lidén, M., Berglund, D., 1997. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Syst. Evol.* 206, 393–410)

Pawłowska S., Pawłowski B. 1970. O kilku roślinach w polskiej części Karpat dotąd nie znanych lub niepewnych. *Acta Floristica, et Geobotanica Polonica*, s. 295-297.

Simpson. 1949. Measurement of Diversity. *Nature*. 688 (163)

Soö. 1937. A Sorbus aria-cosport a Magyar Közephegyseg keleti feleben. *Acta Geobot. Hung.* 1, 215-228;

Widder F. J. (1970): Herbartechnik (II): Die Thermostatpresse. – *Phyton* 14: 175–180.

Tabela 1. Lokalizacja osobników zebranych na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego przyporządkowane do gatunków na podstawie cech morfologicznych (Gatunek, Kod) i po weryfikacji genetycznej (Kod 2, Gatunek 2); X i Y - współrzędne prostokątne płaskie; Przeprowadzone analizy badawcze: MO-morfologia, SSR – analiza mikrosatelitarnych loci DNA, bz – bez zmian

Gatunek	Kod	Lokalizacja	Współrzędne geograficzne		Metoda	Po analizach genetycznych	
			X	Y		Kod 2	Gatunek 2
<i>Sorbus intermedia</i>	J01	Biathlon	417965,6052	5459498,142	MO, SSR	bz	bz
	J02	Brzeziny	429440,7117	5459769,417	MO, SSR	bz	bz
	J03	Brzeziny	429461,0846	5459793,758	MO, SSR	bz	bz
	J04	Brzeziny	429462,6721	5459801,431	MO, SSR	bz	bz
	J05	Biathlon 2	417955,6797	5459351,11	MO, SSR	bz	bz
	J06	Biathlon 3	417957,2672	5459358,518	MO, SSR	bz	bz
	J07	Rondo 1	425198,4379	5459661,904	MO, SSR	bz	bz
	J08	Rondo 2	425202,1421	5459663,492	MO, SSR	bz	bz
	J09	Rondo 3	425204,2587	5459665,608	MO, SSR	bz	bz
	J10	Rondo 4	425206,9046	5459667,725	MO, SSR	bz	bz
	J11	Nosal 1	426024,1161	5459237,203	MO, SSR	A_J11	S. aria
	J12	Huciska	413808,3276	5456935,988	MO, SSR	bz	bz
	J13	Jaworzynka 1	426527,9655	5456734,671	MO, SSR	bz	bz
	J14	Jaworzynka 2	426214,2074	5456689,058	MO, SSR	C_J14	S. carpatica
	J15	Jaworzynka 3	426123,2778	5456670,265	MO, SSR	C_J15	S. carpatica
	J16	Jaworzynka 4	426385,724	5456196,885	MO, SSR	C_J16	S. carpatica
	J17	Kalatówki 1	425198,4379	5457121,37	MO, SSR	C_J17	S. carpatica
	J18	Kalatówki 2	425198,4379	5457121,37	MO, SSR	C_J18	S. carpatica
	J19	Leontynówka 1	427247,9045	5459403,141	MO, SSR	bz	bz
	J20	Leontynówka 1	427247,9045	5459403,141	MO, SSR	bz	bz
	J21	Leontynówka 1	427247,9045	5459403,141	MO, SSR	bz	bz
	J22	Leontynówka 1	427247,9045	5459403,141	MO, SSR	bz	bz
	J23	Kalatówki 3	424613,074	5456786,015	MO, SSR	C_J23	S. carpatica
	J24	Dolina nad Capkami 4	425107,3733	5458351,047	SSR	C_J24	S. carpatica
	J25	Kalatówki 4	425018,919	5457240,845	MO, SSR	C_J25	S. carpatica
	J26	Grzybowiec 1	421244,012	5456527,838	MO, SSR	bz	bz
	J27	Grzybowiec 2	421244,012	5456527,838	MO, SSR	bz	bz
	J28	Grzybowiec 3	421244,012	5456527,838	MO, SSR	bz	bz
	J29	Grzybowiec 4	421244,012	5456527,838	MO, SSR	bz	bz
	J30	Grzybowiec 5	421244,012	5456527,838	MO, SSR	bz	bz
<i>Sorbus carpatica</i>	C01	Błociska	432557,7985	5461026,719	MO, SSR	J_C01	S. intermedia
	C02	Kuźnice	426002,6405	5457975,05	MO, SSR	J_C02	S. intermedia
	C03	Mały Żlebek 1	420745,5589	5458292,207	MO, SSR	J_C03	S. intermedia
	C04	Mały Żlebek 1	420745,5589	5458292,207	MO, SSR	J_C04	S. intermedia
	C05	Mały Żlebek 1	420745,5589	5458292,207	MO, SSR	J_C05	S. intermedia
	C06	Mały Żlebek 1	420745,5589	5458292,207	MO, SSR	J_C06	S. intermedia
	C07	CEP	425188,1191	5459584,646	MO, SSR	J_C07	S. intermedia

	C08	Huciska pod Baniami	414060,2115	5456952,128	MO, SSR	J_C08	S. intermedia	
	C09	Huciska pod Baniami	414060,2115	5456952,128	MO, SSR	J_C09	S. intermedia	
	C10	Huciska pod Baniami	414060,2115	5456952,128	MO, SSR	J_C10	S. intermedia	
	C11	Huciska pod Baniami	414060,2115	5456952,128	MO, SSR	J_C11	S. intermedia	
	C12	Stoły	416926,7526	5456003,239	MO, SSR	J_C12	S. intermedia	
	C13	Dolina nad Capkami 1	425035,266	5458729,824	MO, SSR	A_C13	S. aria	
	C14	Dolina nad Capkami 2	425076,272	5458753,256	MO, SSR	A_C14	S. aria	
	C15	Energetyk	425642,6742	5457551,848	MO, SSR	J_C15	S. intermedia	
	C16	Goryczkowa	425042,3334	5455725,955	SSR	bz	bz	
	C17	Kalatówki	425265,3776	5457197,306	MO, SSR	bz	bz	
	C18	Cisowa Turnia	415645,9021	5458353,537	SSR	J_C18	S. intermedia	
	C19	Cisowa Turnia	415645,9021	5458353,537	SSR	J_C19	S. intermedia	
	C20	Dol. Strażyska	422051,545	5457790,42	SSR	A_C20	S. aria	
	<i>Sorbus aria</i>	A01	Nosal 1	426516,727	5458659,793	MO, SSR	bz	bz
		A02	Nosal 2	426506,6728	5458657,941	MO, SSR	bz	bz
		A03	Nosal 3	426501,9103	5458658,47	MO, SSR	bz	bz
		A04	Nosal 4	426496,354	5458667,466	MO, SSR	bz	bz
		A05	Nosal 5	426483,9186	5458684,135	MO, SSR	bz	bz
		A06	Nosal 6	426341,3079	5458851,087	MO, SSR	bz	bz
		A07	Nosal 7	426213,2493	5458898,712	MO, SSR	bz	bz
A08		Pod Nosalem	426005,0218	5458857,966	MO, SSR	bz	bz	
A09		Kogutki	424790,606	5458843,027	MO, SSR	bz	bz	
A10		Dolina Białego 1	424535,139	5458239,782	SSR	bz	bz	
A11		Kończysta T. 1	418950,515	5457305,876	MO, SSR	bz	bz	
A12		Kończysta T. 2	418910,5628	5457318,576	MO, SSR	bz	bz	
A13		Kończysta T. 3	418905,2711	5457319,37	MO, SSR	bz	bz	
A14		Kończysta T. 4	418905,2711	5457319,37	MO, SSR	bz	bz	
A15		Dolina nad Capkami 3	425082,957	5458326,73	MO, SSR	bz	bz	
A16		Dolina Białego 2	424098,928	5459606,71	MO, SSR	bz	bz	
A17		Mały Kopieniec	427543,7093	5458622,09	MO, SSR	bz	bz	
A18		Gmińska Turnia 1	419961,5295	5457674,086	SSR	bz	bz	
A19		Gmińska Turnia 2	419932,4253	5457681,494	SSR	bz	bz	
A20		Gmińska Turnia 3	419879,2439	5457695,782	SSR	bz	bz	
A21		Krokiew	425694,154	5458756,818	SSR	bz	bz	
A22		Dol. Strażyska 1	422136,868	5457922,417	SSR	bz	bz	
A23		Dol. Strażyska 2	422052,026	5457793,75	SSR	bz	bz	

Tabela 2. Charakterystyka analizowanych markerów mikrosatelitarnych oraz badanych multipleksów w reakcji PCR.

Nr.	Locus	Motyw powtórzeniowy		PCR starter (5 - 3)	Multipleks	Temp. ampl. (st C)	Oczekiwana wielkość produktów (bp)	Znacznik	Źródło
1.	SA01	(GA) ₁₃	F	ATGGAGTTGAGCTCCACATC	I	60	229 (212-254)	6-FAM	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
			R	GGTGGAGGGACAATTGTGTC					
2.	SA03	(GA) ₁₂	F	CACTTCTTCCTGCTGTTTGG	I	60	234 (206-249)	VIC	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
			R	ACTACTGCTACTTCTGTGGG					
3.	SA06	(GA) ₃₂	F	ATTTGATCCATGTGCGACTGCA	I	60	297 (248-297)	PET	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
			R	TGCAGCGGTTGCAGATTGCA					
4.	SA07	(GA) ₁₅	F	ACGTTTTTCAGTATGATGGCC	I	60	334 (325-349)	6-FAM	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
			R	CTTCGCAGTTCATTAAGCAC					
5.	MSS5	(CG) _n	F	CCCCAACAACATTTTTCTCC	I	60	119-143	PET	Oddou-Muratorio et al. 2001b, Kamm et al. 2009
			R	CCTCTCGCTCTTTGCCTCT					
6.	SA02	(GA) ₁₆	F	CTAGGTATCATCTCCGACCA	II	60	293 (270-325)	NED	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
			R	ACGTAGCACTGAATGGTATAG					
7.	SA08	(CT) ₁₆	F	CAGAGAGAGTGCCTGCCT	II	60	249 (233-287)	6-FAM	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
			R	GAATTCTTGGCAGTTTGCCT					
8.	MSS16	(CG) _n	F	CTCCCCTTGTGTGATGCC	II	60	145-156	VIC	Oddou-Muratorio et al. 2001b, Kamm et al. 2009
			R	TTGCCCTCAAAGAATGCC					
9.	CH01h01	(CG) _N	F	GAAAGACTTGCAGTGGGAGC	II	60	93-149	PET	Gianfranceschi et al. 1998, Kamm et al. 2009
			R	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT					
10.	CH01h10	(CG) _N	F	TGCAAAGAAGGTAGATATATGCCA	II	60	95-135	6-FAM	Gianfranceschi et al. 1998, Kamm et al. 2009
			R	AGGAGGGATTGTTTGTGCAC					
11.	BGT23b	(CG) _N	F	CACATTCAAAGATTAAGAT	III	48	191-207	NED	Yamamoto et al. 2002, Kamm et al. 2009
			R	ACTCAGCCTTTTTTCCCAC					
12.	MS14h03	(CG) _N	F	CGCTCACCTCGTAGACGT	III	48	149-209	VIC	Liebhart et al. 2002; Kamm et al. 2009
			R	ATGCAATGGCTAAGCATA					

13.	CH02C09	(CG) _N	F	TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC	III	48	225-249	6-FAM	Liebhard et al. 2002; Kamm et al. 2009
			R	AGAAGCAGCAGAGGAGGATG					
14.	CH02d08	(CG) _N	F	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	III	48	237-265	PET	Liebhard et al. 2002; Kamm et al. 2009
			R	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC					
15.	SA09	(AG) ₁₇	F	CTTGTTGGACGGATTTCTTC	IV	55	174 (161-197)	NED	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
			R	CCAATACTTGAGTAGCATAAC					
16.	SA14	(TC) ₃₀	F	ATGGATTTAGGTTAACAGTTGTC	IV	55	203 (197-232)	PET	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
			R	GAGGTAAAACCTACCAGTATAAC					
17.	SA19.1	(GA) ₂₄	F	AAGTTTACAAGAGTGTGTTTCAG	IV	55	241 (212-250)	VIC	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
			R	GAATTCATGAAAGCAGCTAATG					
18.	rps16	(CATTATATT ATTGATTTTA GTT) _N	F	GTATCCTCATAACTCAAGTTG	IV	55	200-288	6-FAM	Chester et al. 2007, Oxelmann et al. 1997
			R	TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC					

Tabela 3. Charakterystyka testowanych loci mikrosatelitarnego jądrowego DNA. Pogrubione – wartości parametrów najwyższe i najniższe dla badanych loci.

Locus	Liczba alleli	1-D	Hexp	Evenness
MSS5	8	0,772	0,778	0,756
SA01	11	0,829	0,834	0,808
SA06	15	0,869	0,874	0,758
SA07	5	0,534	0,538	0,636
CH01h01	9	0,774	0,778	0,726
CH01h10	3	0,406	0,410	0,631
SA02	9	0,784	0,789	0,737
SA08	11	0,836	0,841	0,844
CH02c09	7	0,769	0,773	0,850
MS14H03	3	0,056	0,056	0,367
SA09	9	0,764	0,769	0,807
SA14	13	0,845	0,850	0,771
SA19	7	0,733	0,739	0,830
mean	8,46	0,690	0,695	0,732

1-D – Indeks Simpsona (Simpson 1949); Hexp – heterozygotyczność (Nei 1978); Evenness – podobieństwo (Pielou, 1975; Ludwig & Reynolds, 1988; Grünwald et al., 2003).

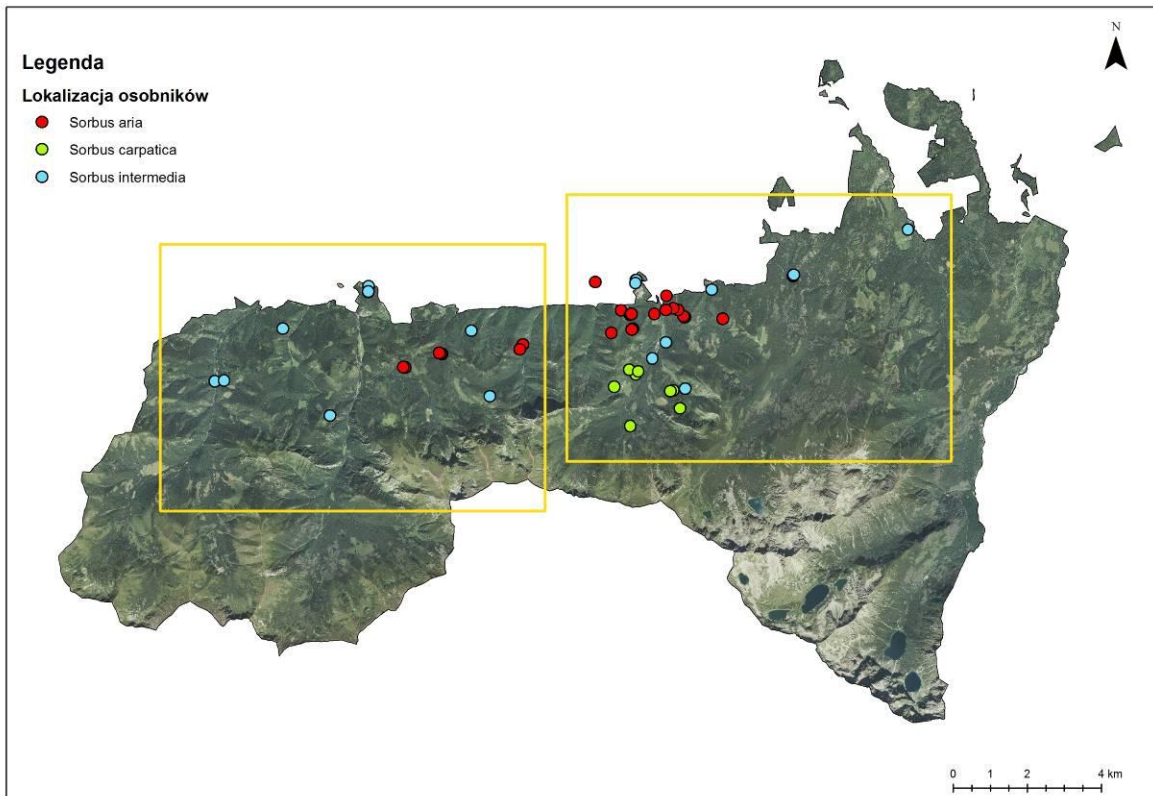
Tabela 4. Wartości parametrów zmienności i zróżnicowania genetycznego badanych rodzajów *Sorbus*.

Gatunek	N	MLG	eMLG	SE	G	E,5	Hexp	rbarD	istotność dla rbarD
<i>S. aria</i>	27	27	10,00	0,00	27,00	1,00	0,623	0,0689	p=0,06
<i>S. intermedia</i>	36	17	6,47	1,27	5,45	0,51	0,481	-0,014	p=1
<i>S. carpatica</i>	10	8	8,00	0,00	6,25	0,848	0,612	0,824	p=0,01
Całkowita	73	52	8,77	1,07	18,96	0,505	0,695	0,47	

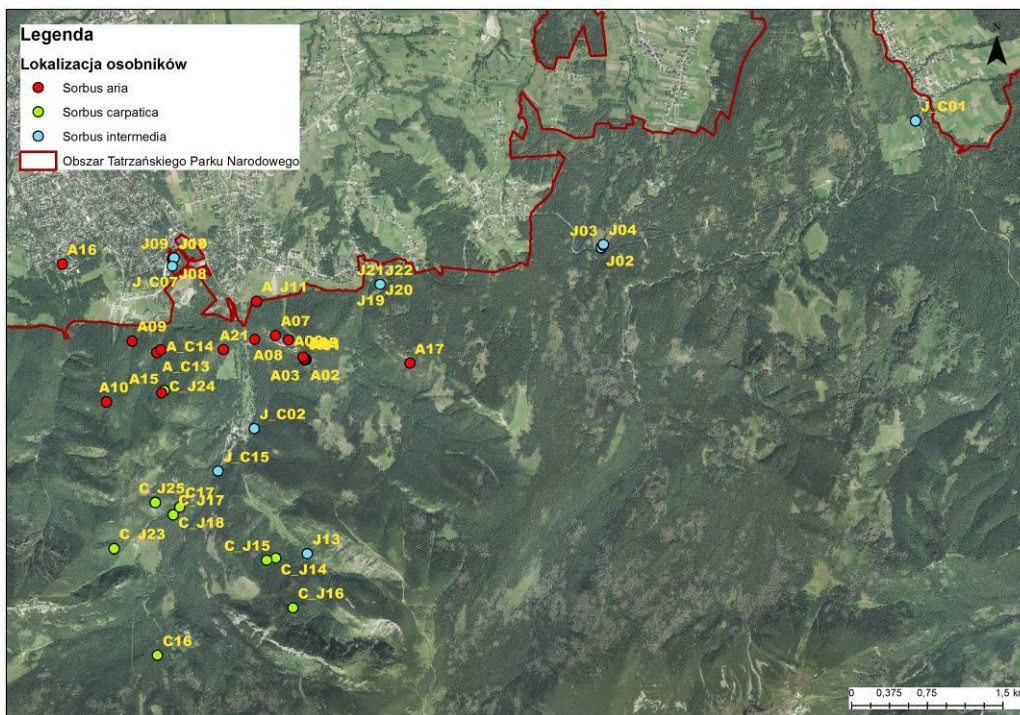
N – liczba osobników, MLG – frekwencja genotypów w wielu loci, eMLG – oczekiwana frekwencja genotypów w wielu loci, SE dla eMLG, błąd standardowy, G – indeks Stoddart & Taylor (1988), E.5 Evenness, , Hexp – heterozygotyczność oczekiwana (Nei 1978), rbarD – indeks asocjacji

Tabela 6. Zasoby zmienności wspólnej.

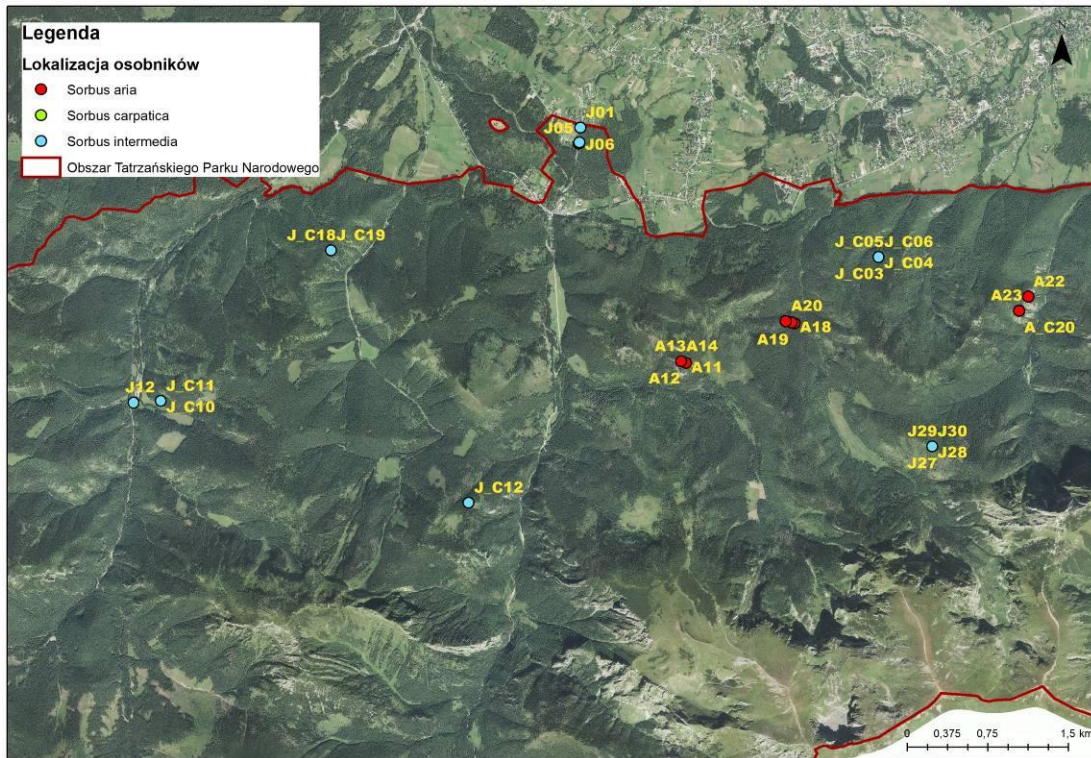
Nr wartości	Wartość własne	% ogółu	Skumul. wartość własna	Skumul. %
1	6,870971	52,85362	6,87097	52,8536
2	2,564146	19,72420	9,43512	72,5778
3	1,688964	12,99203	11,12408	85,5699
4	1,033429	7,94946	12,15751	93,5193
5	0,403660	3,10508	12,56117	96,6244
6	0,180368	1,38744	12,74154	98,0118
7	0,109147	0,83959	12,85068	98,8514
8	0,065999	0,50768	12,91668	99,3591
9	0,043372	0,33363	12,96005	99,6927
10	0,020944	0,16111	12,98100	99,8538
11	0,010949	0,08422	12,99195	99,9381
12	0,005824	0,04480	12,99777	99,9829
13	0,002228	0,01714	13,00000	100,0000



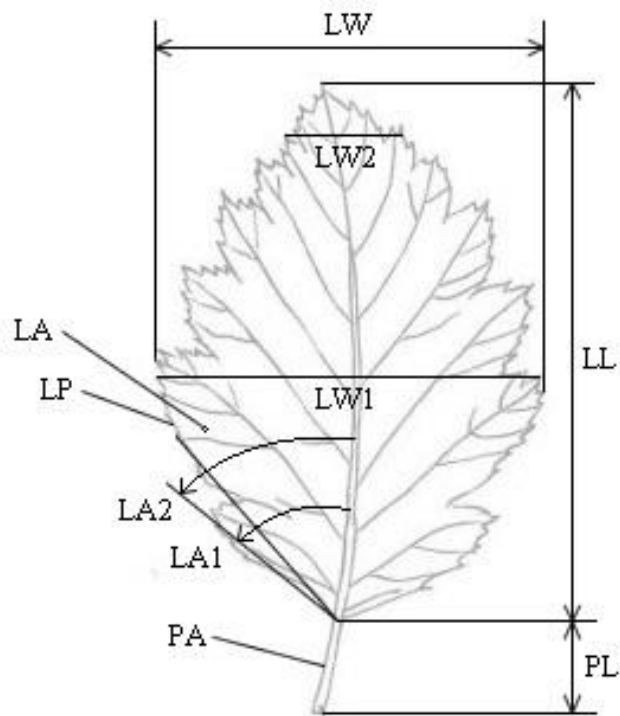
Rycina 1 a. Położenie geograficzne osobników z rodzaju *Sorbus* na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego, z których pozyskano materiał do analizy zmienności genetycznej i cech morfologicznych aparatu asymilacyjnego. (Wygenerowana za pomocą ArcGIS Pro 10.2.2).



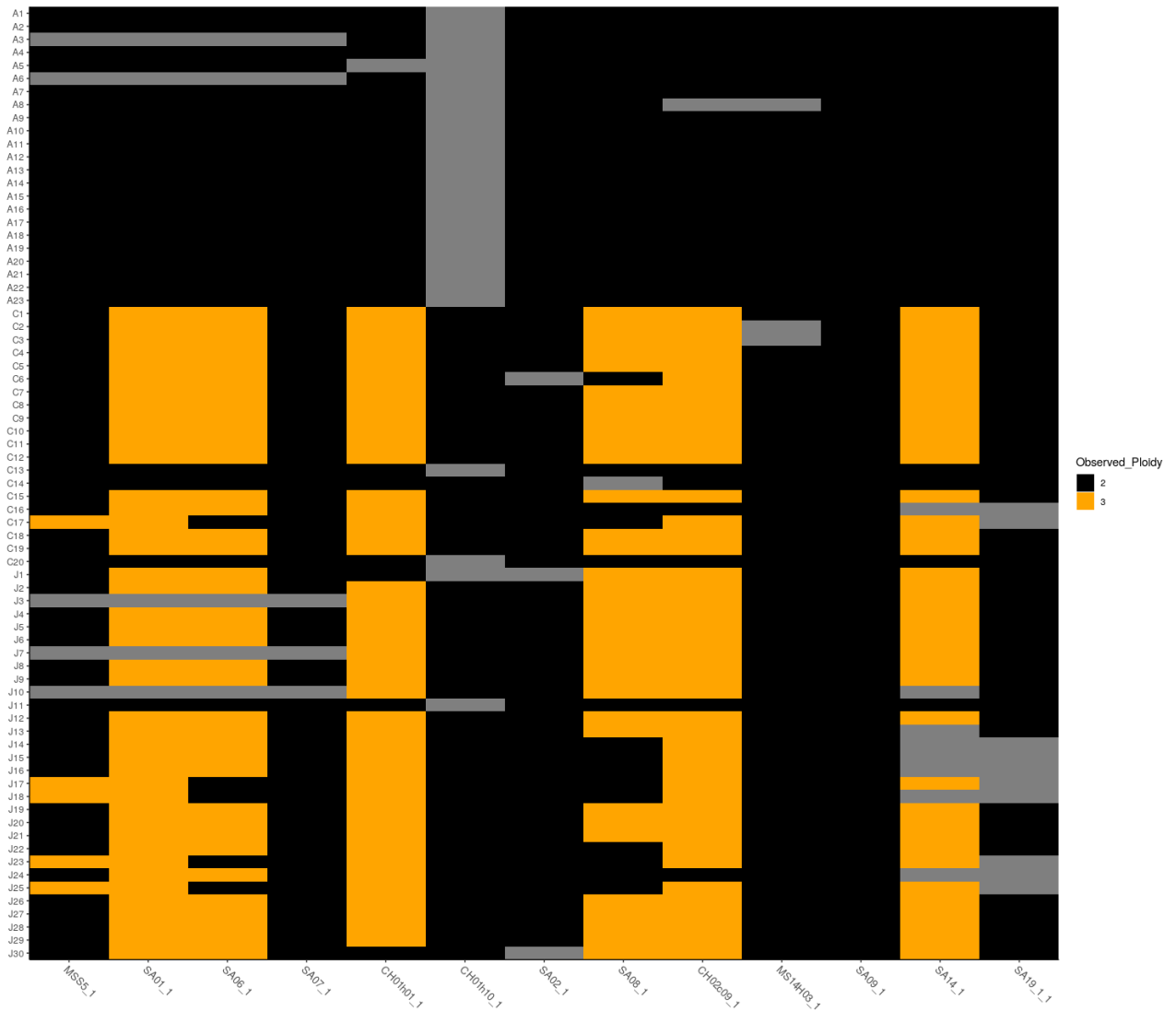
Rycina 1 b. Położenie geograficzne osobników z rodzaju *Sorbus* na terenie wschodniej części Tatrzańskiego Parku Narodowego. Numery osobników zgodnie z Kod 2 zawarty w tabeli 1.



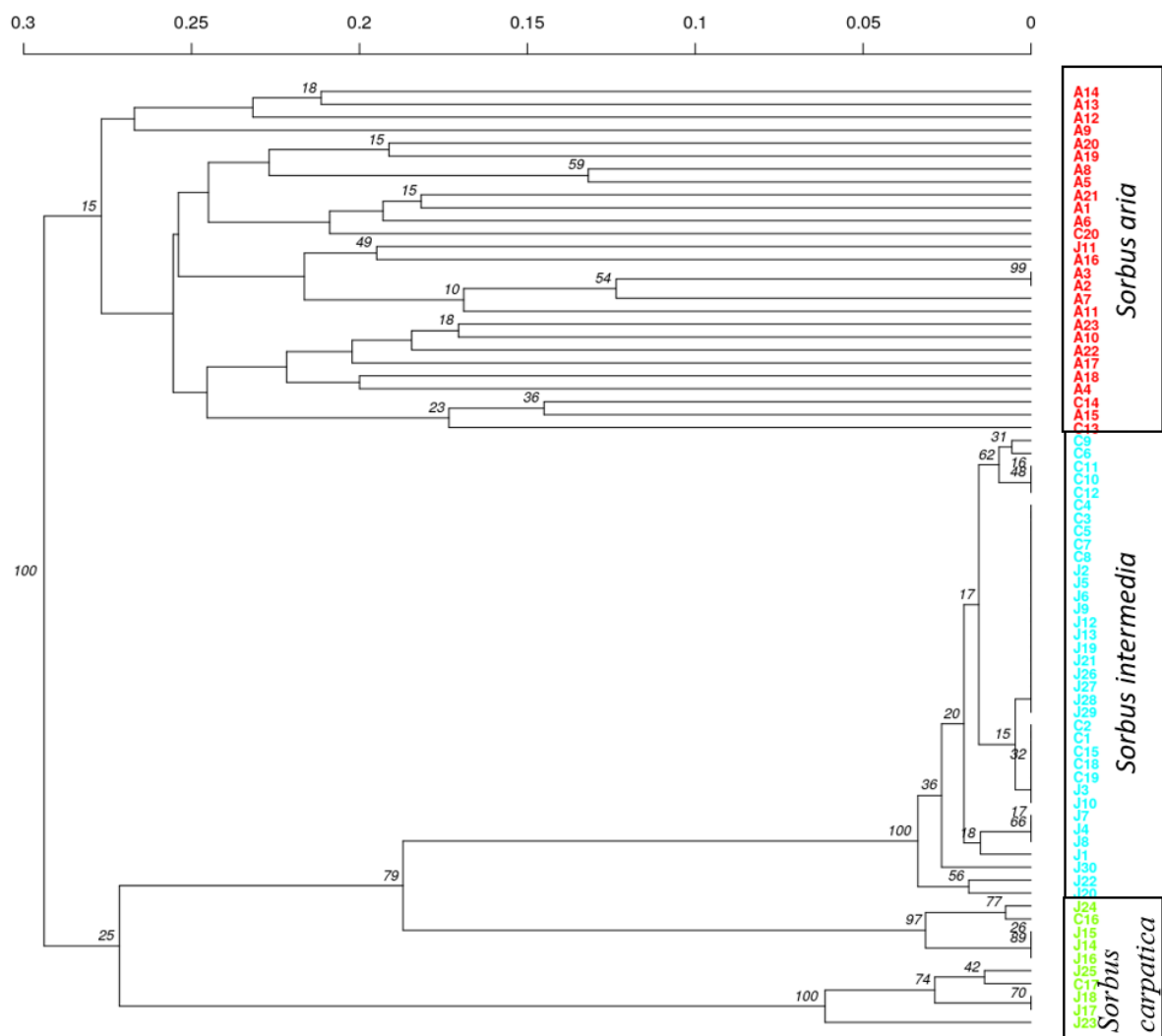
Rycina 1 c. Położenie geograficzne osobników z rodzaju *Sorbus* na terenie zachodniej części Tatrzańskiego Parku Narodowego. Numery osobników zgodnie z Kod 2 zawarty w tabeli 1.



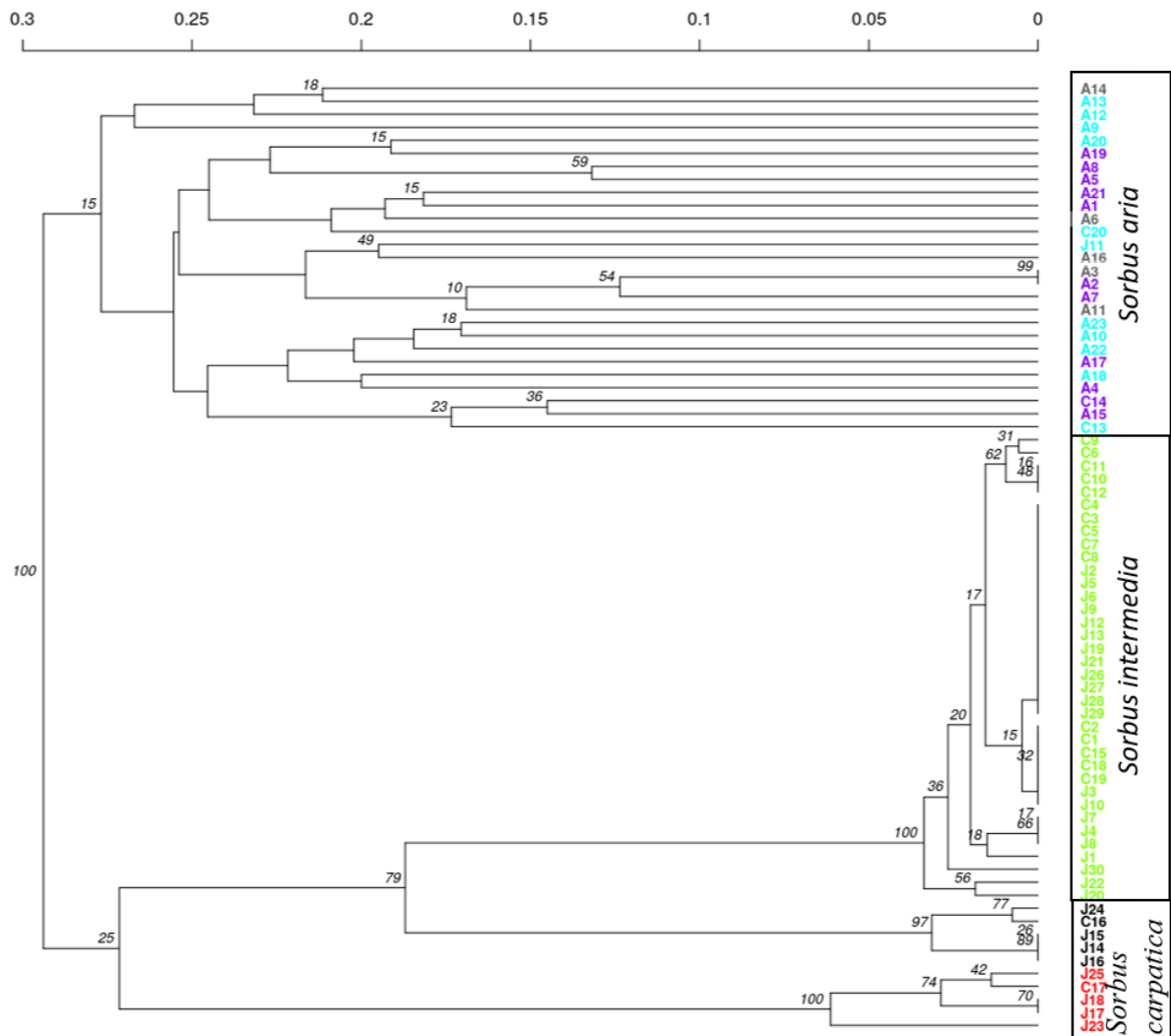
Rycina. 2. Cechy morfologiczne aparatu asymilacyjnego poddane analizie. Opis skrótów w tekście powyżej.



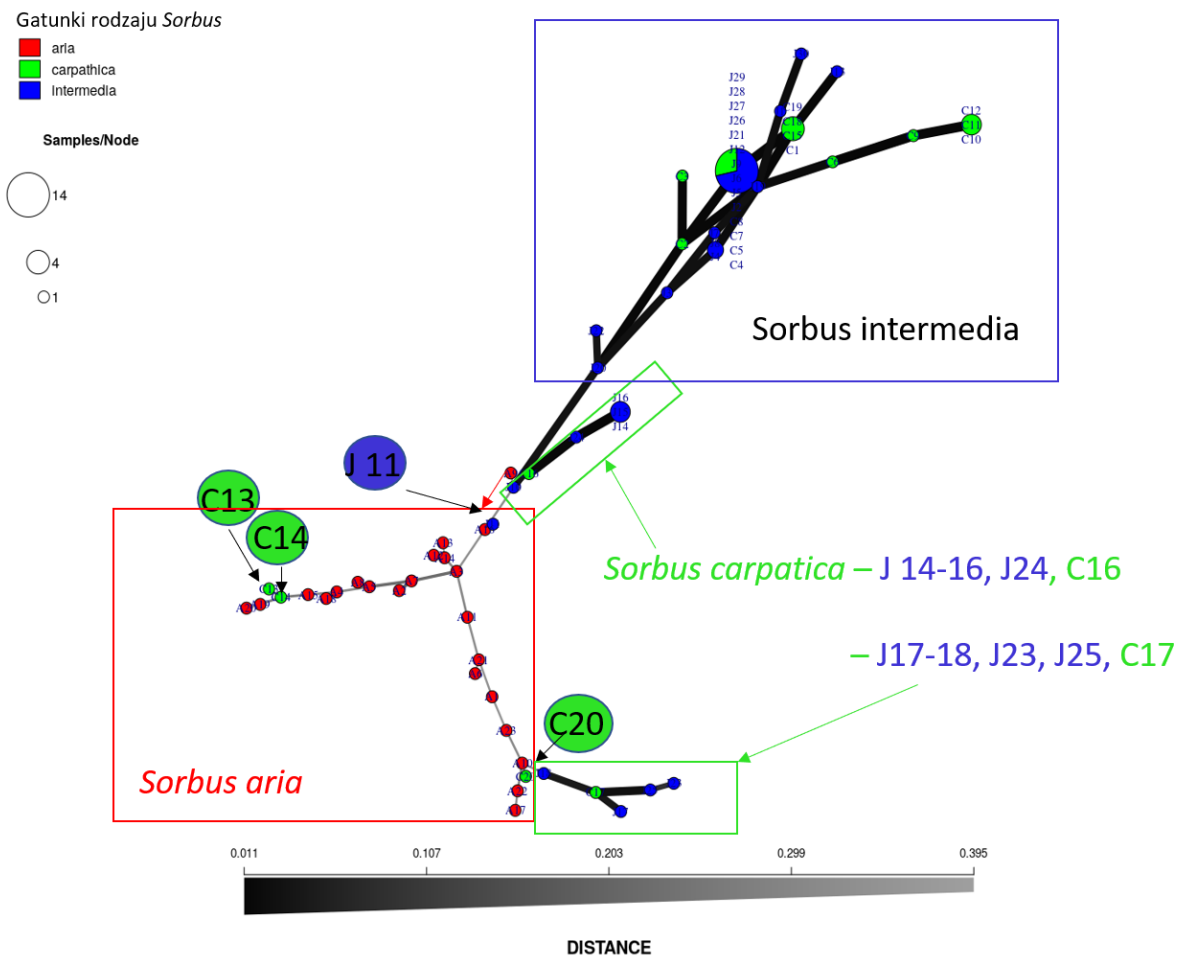
Rycina 3. Obraz poliploidalności dla badanych loci oraz gatunków rodzaju *Sorbus*. Czarne kratki oznaczają dwa allele w locus, żółte – 3 allele w locus, szary kolor oznacza brak wyniku. Oś X – testowane loci, oś Y - osobniki przypisane do poszczególnych gatunków A – *S. aria*, C – *S. carpatica*, J – *S. intermedia*



Rycina 4. Dendrogram prezentujący dystans genetyczny pomiędzy badanymi drzewami rodzaju *Sorbus*. Kolor czerwony oznacza grupę *S. aria*, kolor niebieski *S. intermedia* i kolor zielony *S. carpatica*.

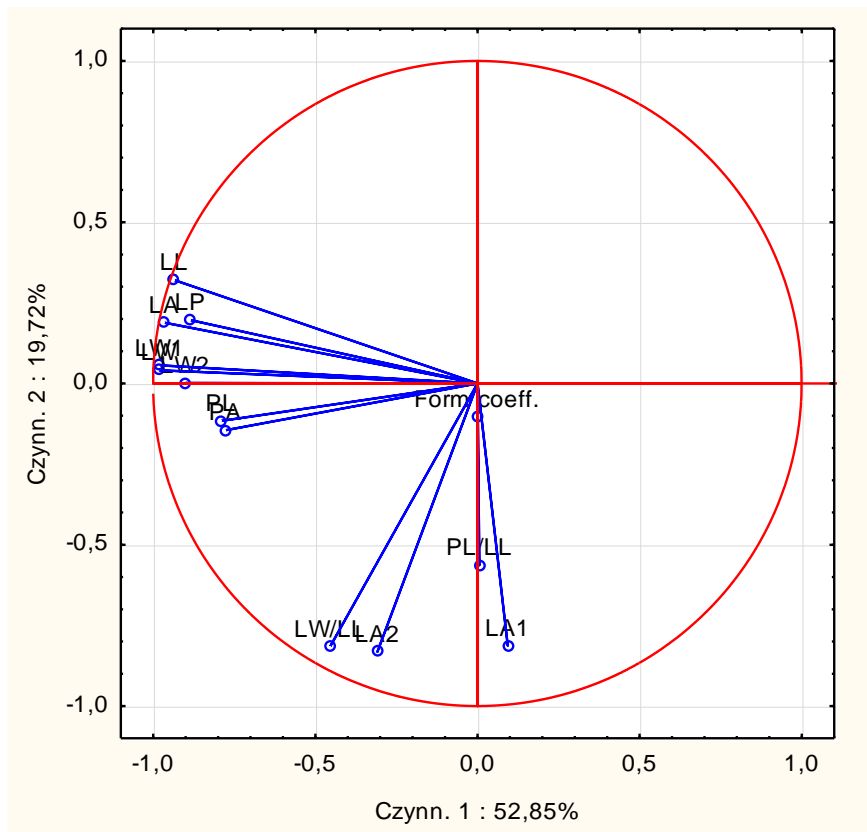


Rycina 5. Dendrogram prezentujący dystans genetyczny pomiędzy badanymi drzewami rodzaju *Sorbus*. Analiza klastrow z $K = 6$, kolor niebieski, fioletowy i szary oznacza grupę *S. aria*, zielony – *S. intermedia* i kolor czerwony i czerwony – *S. carpatica*.

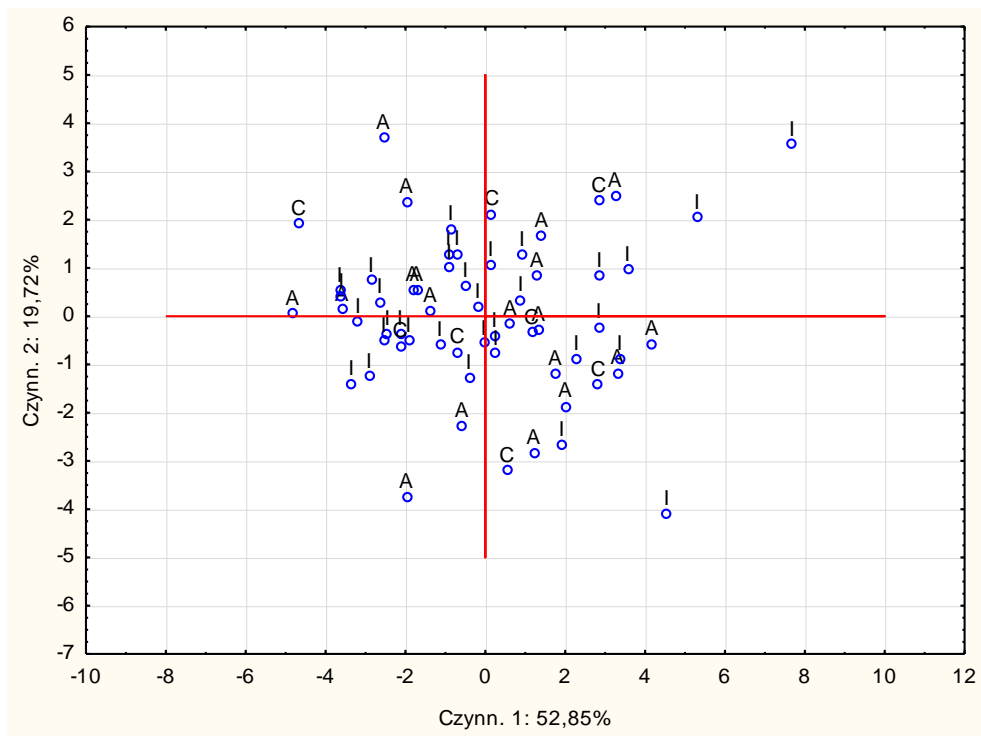


Rycina 6. Wynik analizy MNS na podstawie frekwencji genotypów.

A)



B)



Rycina 7. Rzut zmiennych (A) i przypadków (B) na płaszczyznę czynników.