

Morfologiczne i anatomiczne zróżnicowanie populacji kosodrzewiny (*Pinus mugo* Turra) z polskich Tatr wyrażone w cechach igieł

Population differences in morphological and anatomical traits of *Pinus mugo* Turra needles from the Polish part of the Tatra Mountains

Ewa M. Pawlaczyk*, Alina Bączkiewicz, Piotr Wawrzyniak,
Magdalena Czołpińska, Patrycja Gonera, Katarzyna Buczkowska

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

*Tel. +48 61 8295866, e-mail: ewapaw@amu.edu.pl

Abstract. The main aim of this study was to describe the variation between the populations of the dwarf mountain pine *Pinus mugo* Turra based on the morphological and anatomical traits of their needles, and to investigate the relationship between the observed variation and environmental conditions (altitude and substrate). Two-year-old needles were collected from 180 individuals of six populations of *P. mugo* growing in the Tatra Mts. Two populations were classified as dense, located at 1360–1450 m altitude, and the remaining four formed loose clusters and were situated at 1500–1650 m altitude. Four of the populations are growing on granite and two on a limestone substrate. The natural variation of 10 morpho-anatomical and 3 synthetic needle traits was measured. In addition to descriptive statistics, the analyses of variance (ANOVA) with a Tukey test and principal component analysis were computed. We also estimated Pearson correlation coefficients for the examined needle traits and altitude as well as substrate. Our results indicate that the *P. mugo* populations differ significantly with regard to the investigated traits for which the Trzydniowiański Wierch population was the most distinct. The observed pattern of variability is largely caused by differences in stomatal traits and these features are positive correlated with altitude. Additionally, populations growing on granite have larger values for most of the examined traits compared to populations growing on limestone.

Keywords: dwarf mountain pine, Tatra Mts., variability, needle, altitude, substrate

1. Wstęp

Pinus mugo Turra (kosodrzewina) występuje w Tatrach i na Babiej Górze w pasie subalpejskim, zwanym pasem kosodrzewiny oraz na oligotroficznych torfowiskach wysokich, ale jedynie w nielicznych niższych partiach gór. Obie strefy charakteryzuje deficyt składników odżywczych, z tego względu są one niedostępne dla wielu gatunków drzew. Kosodrzewina zaliczana jest do gatunków pionierskich (Piękoś-Mirkowa et al. 1996), ponieważ zajmuje obszary niedostępne dla innych roślin drzewiastych, a duża tolerancja na panujące warunki siedliskowe powoduje, że ma wyjątkową zdolność przystosowawczą i rośnie zarówno na glebach alkalicznych (wapienie, dolomity), jak i kwaśnych (granity, torfowiska) (Christensen 1987a).

Istnieje stosunkowo niewiele danych, w porównaniu do *Pinus sylvestris*, opisujących zmienność morfologiczną kosodrzewiny z różnych miejsc jej występowania (m in.: Bobo-

wicz, Krzakowa 1986; Bączkiewicz, Głowacki 1997, 2005; Bączkiewicz et al. 2005; Boratyńska et al. 2005, 2014, 2015), a większość prac opisujących ją dotyczy badań mających na celu opis naturalnych mieszańców *P. mugo* i *P. sylvestris* (m.in.: Staszkiwicz 1993; Bączkiewicz 1995; Boratyńska, Bobowicz 2000, 2001), zatem nieporównujących poziomu zmienności populacji z różnych środowisk, a głównie skupiających się na różnicach gatunkowych. Jak wykazały dotychczasowe badania u roślin iglastych, często różnice w morfologii są odpowiedzią na różne warunki środowiska (Lukáčik, Repáč 1992; Kmet' et al. 1994; Bączkiewicz et al. 2005; Urbaniak 1998; Urbaniak et al. 2003; Pawlaczyk et al. 2010). U kosodrzewiny różnice te mogą być powodowane naturalnymi barierami geograficznymi występującymi w górach, powodującymi izolację występujących tam populacji, czy czynnikami klimatycznymi związanymi z gradientem wysokości nad poziomem morza. Nie można jednoznacznie

określić, czy większy wpływ na różnice morfologiczne mają czynniki ekologiczne czy związane z wysokością nad poziomem morza warunki klimatyczne.

Celem niniejszej pracy jest porównanie poziomu zmienności morfologicznej i anatomicznej igieł *P. mugo* rosnących na różnych podłożach (wapień, granit) w powiązaniu do gradientu wysokości nad poziomem morza.

2. Materiał i metody

Materiał roślinny

Materiałem do badań były dwuletnie igły kosodrzewiny (*Pinus mugo*) zebrane z 6 populacji rosnących w Tatrach (ryc. 1). Dwie populacje zlokalizowane na wysokości od 1360 do 1450 m n.p.m. (Wielka Świstówka i Dolina Chochołowska Wyżnia), czyli poniżej piętra kosodrzewiny, natomiast pozostałe cztery na wysokości od 1500 do 1650 m n.p.m., czyli w piętrze kosówki. W wypadku czterech z nich (pochodzące z Doliny Jarzączej, Doliny Chochołowskiej Wyżnej, Długiego Uplazu i Trzydniowiańskiego Wierchu) podłoże stanowiły skały granitowe, a dla dwóch (z Wielkiej Świstówki i Dziurawego) wapień.

Próby zbierano losowo z 30 osobników z każdej populacji, w transekcie co 20 m. Metoda zbioru materiału badawczego była taka sama jak opisana szczegółowo w pracach: Boratyńskiej i Bobowicz (2000; 2001) oraz Boratyńskiej i Boratyńskiego (2003). Zebrane igły były przechowywane w 70% etanolu aż do rozpoczęcia analiz. Z każdego osobnika zbadano po 10 igieł. Ogółem przeanalizowano 1800 igieł ze 180 osobników.

Metody biometryczne

Każda igła została przebadana pod względem 10 cech morfologicznych i anatomicznych oraz 3 cech przeliczeniowych (tab. 1). W celu dokonania pomiarów cech anatomicz-

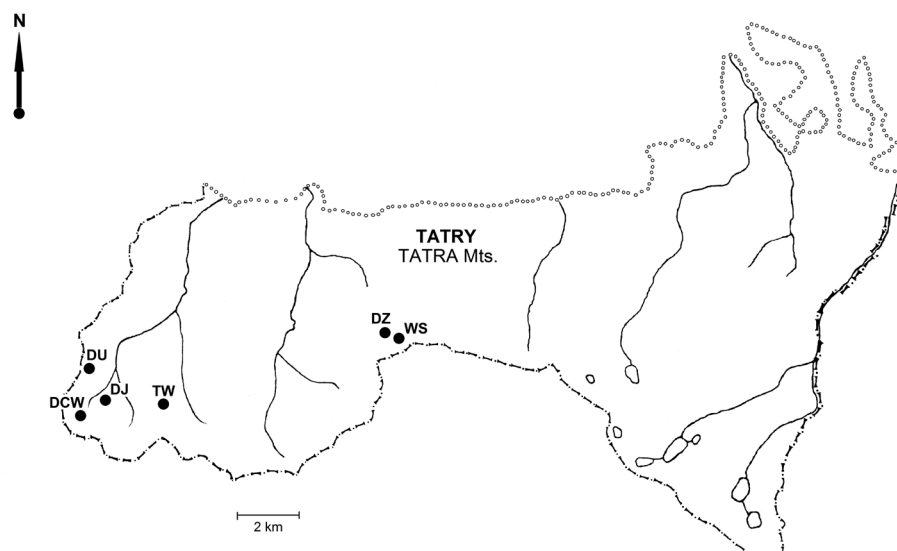
nych igieł wykonano preparaty – wycięto skrawki w połowie długości igły uzyskując przekrój poprzeczny. Tak otrzymane preparaty utrwalono, zatapiając je w alkoholu poliwinylowym. Następnie wykonywano zdjęcia preparatów kamerą firmy Olympus pod mikroskopem świetlnym, a przy użyciu programu Cell B (Olympus Corporation) dokonano pomiarów cech igieł.

Metody statystyczne

Uzyskane dane biometryczne poddano analizom statystycznym za pomocą programu Statistica v. 12.0 (StatSoft PL). Obliczono charakterystyki cech: średnią arytmetyczną, wartość minimalną i maksymalną, odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności (Ferguson, Takane 2009), współczynniki korelacji pomiędzy cechami i wysokością nad poziomem morza (Łomnicki 2014), przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) wraz z testem Tukeya, test *t*-Studenta (Triola 1998) i analizę składowych głównych, określono odległości Mahalanobisa oraz skonstruowano dendrogram metodą najbliższego sąsiedztwa na odległościach Euklidesa. Przed wykonaniem obliczeń, sprawdzono normalność rozkładu badanych cech w poszczególnych populacjach testem W Shapiro-Wilk'a oraz testem Levene'a jednorodność wariancji. Odpowiedź twierdząca pozwoliła na wykonanie testów parametrycznych.

3. Omówienie wyników i dyskusja

Analizując różnice między populacjami można stwierdzić, że największą odrębność wykazuje populacja rosnąca na zboczu Trzydniowiańskiego Wierchu (TW). Wskazują na to odległości Mahalanobisa obliczone między populacjami, analiza składowych głównych (ryc. 2) oraz dendrogram zbudowany na podstawie najkrótszych odległości Euklidesa (ryc. 3). Populacja ta rośnie na podłożu granitowym, na wysokości 1600–1650 m n.p.m. Z trzynastu, sześć cech miało



Rycina 1. Rozmieszczenie sześciu badanych populacji w Tatrach. Symbole: DCW – Dolina Chochołowska Wyżnia, DJ – Dolina Jarzącza, TW – Trzydniowiański Wierch, WS – Wielka Świstówka, DU – Długi Uplaz, DZ – Dziurawe

Figure 1. The localities of six studied populations in the Tatra Mts. Symbols: DCW – Dolina Chochołowska Wyżnia, DJ – Dolina Jarzącza, TW – Trzydniowiański Wierch, WS – Wielka Świstówka, DU – Długi Uplaz, DZ – Dziurawe

Tabela 1. Badane cechy igiel *Pinus mugo*Table 1. Studied needle traits of *Pinus mugo*

Nr / No.	Cechy / Traits
1.	Liczba rzędów aparatów szparkowych na wypukłej stronie igły / Number of stomata rows on convex (abaxial) side of needle
2.	Liczba rzędów aparatów szparkowych na płaskiej stronie igły / Number of stomata rows on flat (adaxial) side of needle
3.	Iloraz rzędów z aparatami szparkowymi (cecha 1/2) / Stomata row index (trait 1/2)
4.	Liczba aparatów szparkowych na 2 mm długości po wypukłej stronie igły / Mean number of stomata in a 2-mm-long section of convex (abaxial) side of needle
5.	Liczba aparatów szparkowych na 2 mm długości po płaskiej stronie igły / Mean number of stomata in a 2-mm-long section of flat (adaxial) side of needle
6.	Liczba kanałów żywicznych na przekroju poprzecznym / Number of resin canals on cross-section
7.	Wysokość komórek epidermy w μm / Height of epidermal cells in μm
8.	Szerokość komórek epidermy w μm / Width of epidermal cell in μm
9.	Szerokość igły na przekroju poprzecznym w μm / Needle width on cross-sections in μm
10.	Wysokość igły na przekroju poprzecznym w μm / Needle height on cross-sections in μm
11.	Odległość pomiędzy wiązkami przewodzącymi w μm / Distance between vascular bundles, in μm
12.	Iloraz wysokości do szerokości igły (cecha 10/9) / Needle height to needle width ratio (trait 10/9)
13.	Wskaźnik Marcet'a (cecha 9 x 11/10) / Marcet's coefficient (trait 9 x 11 / 10) (Marcet 1967)

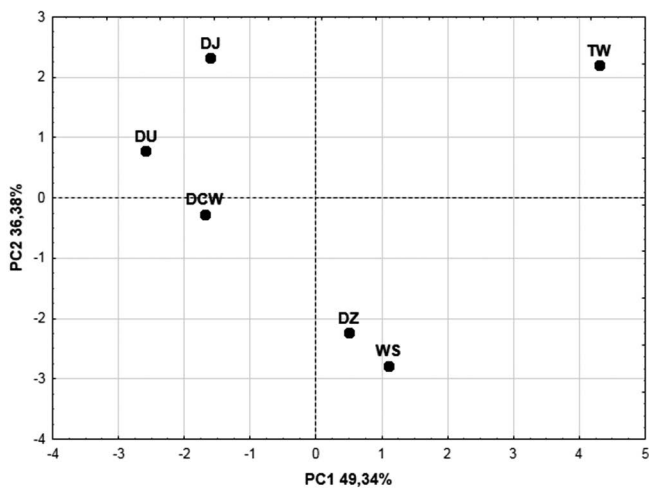
**Rycina 2. Analiza składowych głównych dla sześciu badanych populacji**

Figure 2. Principal component analysis (PCA) for six studied populations

najwyższą średnią wartość spośród badanych populacji, a cztery najniższą (tab. 2). Do pierwszej grupy należą cechy opisujące zagęszczenie aparatów szparkowych w igle tj.: liczba rzędów aparatów szparkowych na płaskiej i wypukłej stronie igły (#1 i #2) oraz liczba aparatów szparkowych na 2 mm długości po obu stronach igły (#4 i #5). Ich wartości były wyższe w porównaniu z badaniami innych autorów na kosodrzewinie z Tatr Zachodnich (Boratyńska 2002), a także wyższe niż z populacji ukraińskich (Boratyńska, Pashkevich 2001). Cechy te, w porównaniu z pozostałymi populacjami, miały też najwyższe wartości maksymalne (odpowiednio 16;

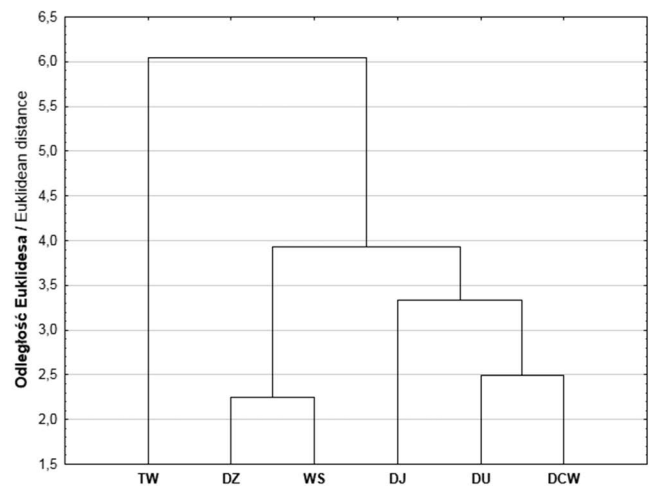
**Rycina 3. Dendrogram sześciu badanych populacji kosodrzewiny skonstruowany metodą najbliższego sąsiedztwa**

Figure 3. Dendrogram of six studied populations of dwarf mountain pine constructed based on the nearest neighborhood method

15; 24,6 i 24,6) i minimalne (odpowiednio 8; 7; 19,6 i 18) oraz charakteryzowały się niewielkim zakresem zmienności (tab. 2). Ponadto do pierwszej grupy należała liczba kanałów żywicznych na przekroju poprzecznym (#6) – cecha ta, w przeciwieństwie do poprzednich, charakteryzowała się dużym zakresem zmienności (tab. 2). Do drugiej grupy cech, charakteryzujących się tym, że w populacji TW miały najniższą średnią spośród wszystkich badanych populacji, należał iloraz rzędów z aparatami szparkowymi (#3), czyli proporcja liczby rzędów aparatów szparkowych z wypukłej i płaskiej strony igły (#1 i #2). Jej średnia wynosiła 1,1, co

świadczy o tym, że liczba rzędów aparatów szparkowych po obu stronach igły jest podobna, podczas gdy w pozostałych populacjach po wypukłej stronie igły liczba rzędów aparatów szparkowych była wyraźnie większa (tab. 2). Następane dwie cechy, które charakteryzowały się niskimi wartościami, dotyczą wysokości i szerokości komórek epidermy (#7 i #8). Epiderma igieł w populacji TW była cienka i zbudowana z drobnych komórek (odpowiednio, 20,84 μm i 11,80 μm). Odległość między wiązkami przewodzącymi (#11) w populacji TW była również najmniejsza i wahała się od 0,470 do 0,651 (średnio 0,56), jednak nie odbiegała ona znacząco od innych populacji (tab. 2). Do cech o najniższej średniej należała też odległość między wiązkami przewodzącymi, która średnio wynosiła 0,562 mm (#11). Tak więc populacja z Trzydniwiańskiego Wierchu charakteryzowała się największą liczbą szparek w igłach oraz najcieńszą epidermą igieł w porównaniu z pozostałymi badanymi populacjami.

Od populacji z Trzydniwiańskiego Wierchu najbardziej różniła się populacja rosnąca w Dolinie Chochołowskiej Wyżnej (DCW), na wysokości 1400 m n.p.m. Odległość Mahalanobisa między tymi populacjami wynosiła 11,94. Liczba szparek na stronie wypukłej i płaskiej igły (#1, #2, #4, #5) w przeciwieństwie do populacji TW była tu jedną z najniższych, natomiast grubość epidermy (#7 i #8), także w przeciwieństwie do populacji TW, była znacznie większa (tab. 2). Populacja DCW wykazywała największe podobieństwo do populacji rosnącej na stoku Długiego Uplazu (DU) na wysokości 1500 m n.p.m. (ryc. 2 i 3). Obie populacje cechowały się stosunkowo małą liczbą szparek na obu stronach igły (#1, #2, #4, #5), znaczną różnicą między liczbą rzędów szparek na stronie wypukłej i płaskiej (#3), szerokimi komórkami epidermy (#8) i wysokimi (grubymi) igłami (#10, #11, #12) (tab. 2). Obie populacje, podobnie jak populacja TW, rosły na podłożu granitowym, jednak populacja DU o ponad 100 m wyżej od DCW i 100 m niżej od TW, co mogło mieć wpływ na sposób wykształcenia niektórych cech.

Z kolei najbardziej podobnymi spośród badanych populacji były populacje z Wielkiej Świstówki (WS) i z Dziurawego (DZ), co można zauważyć na wykresie analizy składowych głównych (ryc. 2) i dendrogramie (ryc. 3). Odległość Mahalanobisa między nimi wyniosła 2,21. Obie populacje rosły na podłożu wapiennym, geograficznie blisko siebie (ryc. 1), jednak na różnych wysokościach (WS na wysokości 1360–1450 m n.p.m. a DZ na 1600–1630 m n.p.m.). Zakres zmienności większości cech (#1, #2, #4, #5, #6, #7, #8, #12 i #13) w tych populacjach był podobny (tab. 2). Obie populacje charakteryzowały się niską liczbą szparek po obu stronach igieł, przy czym populacja WS charakteryzowała się najniższą liczbą rzędów aparatów szparkowych na wypukłej stronie igły (#1) (8,51) spośród badanych populacji, a populacja DZ najniższą liczbą aparatów szparkowych na 2 mm długości na płaskiej stronie igły (#5) (17,68) (tab. 2). Obie populacje (DZ i WS) cechowały się też najniższą liczbą kanałów żywicznych na przekroju poprzecznym (#6), która wynosiła średnio, odpowiednio: 3,43 i 3,49, płaskimi igłami (#12, odpowiednio: 0,044 mm i 0,041 mm) oraz niskim wskaźnikiem

Marcet'a (#13, odpowiednio: 0,076 i 0,070) (tab. 2). Płaskie igły w populacji rosnącej na podłożu wapiennym to cecha odnotowana również przez Bączkiewicz et al. (2005), jednak w przeciwieństwie do obecnie opisywanych populacji igły te miały więcej aparatów szparkowych niż te z populacji rosnącej na podłożu granitowym. Na podobieństwo obu badanych populacji mogły więc mieć wpływ nie tylko podobne warunki ekologiczne, ale również niewielka odległość geograficzna sprzyjająca wymianie genów między tymi populacjami.

Ostatnia z badanych populacji – z Doliny Jarząbcej (DJ), rosnąca na podłożu granitowym na wysokości od 1530 do 1580 m n.p.m., cechowała się największą szerokością igieł na przekroju poprzecznym 1,3624 mm (#9), najwyższym wskaźnikiem Marcet'a – 0,173 (#13) oraz najszerszymi i najwyższymi komórkami epidermy (#7 i #8, odpowiednio: 25,95 μm i 15,24 μm) (tab. 2). Komórki epidermy tej populacji były większe niż u osobników pozostałych populacji poddanych badaniom oraz nieco większe niż u populacji ukraińskich (średnio 22,51 μm i 14,29 μm) (Boratyńska, Pashkevich 2001), jednak bardziej spłaszczone w stosunku do kosodrzewiny z Tatr Zachodnich (27,45 μm) (Boratyńska 2002). Na dendrogramie populacja z Doliny Jarząbcej ma pośredni charakter pomiędzy populacjami rosnącymi na podłożu wapiennym (DZ, WS), a tymi na podłożu granitowym (DU i DCW) (ryc. 2 i 3). Na podobieństwo populacji DJ do występujących na podłożu wapiennym wpłynęły 3 cechy dotyczące: liczby rzędów aparatów szparkowych na wypukłej i płaskiej stronie igły (#1, #2) oraz liczba aparatów szparkowych na 2 mm długości po wypukłej stronie igły (#4), a na podobieństwo do populacji DU i DCW wpłynęło 5 cech: liczba aparatów szparkowych na 2 mm długości po płaskiej stronie igły (#5), liczba kanałów żywicznych na przekroju poprzecznym (#6), szerokość komórek epidermy (#8), szerokość igły na przekroju poprzecznym (#9) i wysokość igły na przekroju poprzecznym (#10).

W oparciu o powyższy opis nasuwa się wniosek, że badane populacje cechują się dużą odrębnością. Potwierdzają to obliczone odległości Mahalanobisa, które są statystycznie istotne pomiędzy wszystkimi populacjami ($p < 0,001$), a także analiza wariancji (ANOVA) i test Tukey'a.

Test Tukey'a wskazuje, które populacje różnią się od siebie pod względem każdej z badanych 13 cech igieł. I tak pod względem liczby rzędów aparatów szparkowych na wypukłej stronie igły (#1) wszystkie populacje różnią się od siebie, za wyjątkiem populacji z Doliny Chochołowskiej Wyżnej (DCW), która nie różni się od Wielkiej Świstówki (WS), Długiego Uplazu (DU) i Dziurawego (DZ) oraz dodatkowo populacji z Długiego Uplazu (DU), która nie różni się od tej z Dziurawego (DZ). Liczba rzędów aparatów szparkowych na płaskiej stronie igły (#2) najbardziej odróżnia od pozostałych populacji z Trzydniwiańskiego Wierchu (TW) i z Doliny Jarząbcej (DJ). Pozostałe populacje nie różnią się. Populacje z Trzydniwiańskiego Wierchu (TW) i z Doliny Jarząbcej (DJ) mają najwyższe wartości tych dwóch cech (tab. 2). Pod względem ilorazu rzędów z aparatami szparkowymi (#3) prawie wszystkie populacje różnią się między

Tabela 2. Statystyki opisowe 13 cech igiel dla badanych sześciu populacji kosodrzewiny. Symbole: M – średnia arytmetyczna, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, SD – odchylenie standardowe, V% – współczynnik zmienności

Table 2. Descriptive statistics of 13 needle traits for studied six populations of dwarf mountain pine. Symbols: M – arithmetic mean, Min – minimal value, Max – maximal value, SD – standard deviation, V% – coefficient of variability

Cecha Trait	Populacja Population	M	Min	Max	SD	V%	Cecha Trait	Populacja Population	M	Min	Max	SD	V%
1	DZ	9,52	5,0	12,0	1,24	13,01	8	DZ	12,31	7,2	19,1	2,06	16,70
	WS	8,51	5,0	12,0	1,29	15,17		WS	12,50	4,8	19,1	2,43	19,47
	DJ	10,66	7,0	14,0	1,07	10,06		DJ	15,24	9,6	23,9	2,43	15,93
	DU	9,45	6,0	12,0	1,38	14,61		DU	14,10	9,6	19,1	2,00	14,15
	TW	12,83	8,0	16,0	1,25	9,76		TW	11,80	7,2	16,7	2,06	17,48
	DCW	8,88	6,0	11,0	1,10	12,40		DCW	14,17	9,6	19,1	2,14	15,18
2	DZ	6,94	5,0	11,0	1,09	15,67	9	DZ	1,2934	1,056	1,632	0,10	7,85
	WS	6,66	4,0	9,0	1,10	16,51		WS	1,2347	0,960	1,670	0,11	8,96
	DJ	8,50	6,0	11,0	1,12	13,17		DJ	1,3624	1,152	1,670	0,10	7,46
	DU	7,03	5,0	11,0	1,31	18,56		DU	1,3317	1,018	1,632	0,14	10,43
	TW	11,51	7,0	15,0	1,35	11,69		TW	1,3062	1,075	1,594	0,11	8,10
	DCW	6,53	5,0	10,0	1,01	15,50		DCW	1,2989	1,018	1,651	0,11	8,43
3	DZ	1,40	0,8	4,1	0,27	19,15	10	DZ	0,7398	0,595	0,979	0,07	8,91
	WS	1,29	0,8	2,0	0,20	15,15		WS	0,7151	0,576	0,902	0,08	10,50
	DJ	1,25	1,0	1,7	0,16	12,57		DJ	0,7779	0,557	0,941	0,07	8,52
	DU	1,36	1,0	2,0	0,18	13,38		DU	0,7942	0,595	1,344	0,08	10,31
	TW	1,12	0,9	1,4	0,09	8,24		TW	0,7336	0,576	0,922	0,06	8,44
	DCW	1,37	0,9	2,0	0,19	13,94		DCW	0,7610	0,614	0,998	0,06	8,23
4	DZ	18,44	14,0	21,6	1,45	7,87	11	DZ	0,5725	0,494	0,705	0,03	5,83
	WS	19,12	15,3	22,0	1,43	7,49		WS	0,5799	0,436	0,811	0,04	7,56
	DJ	18,24	15,3	21,6	0,97	5,30		DJ	0,5717	0,468	0,746	0,04	6,58
	DU	16,99	14,3	20,0	1,21	7,11		DU	0,5980	0,481	0,875	0,04	7,05
	TW	21,57	19,6	24,6	0,94	4,37		TW	0,5625	0,470	0,651	0,03	6,09
	DCW	17,18	14,6	20,6	1,16	6,76		DCW	0,5869	0,494	0,717	0,03	5,65
5	DZ	17,68	13,0	20,6	1,25	7,08	12	DZ	0,044	0,02	0,07	0,01	28,97
	WS	18,16	14,6	21,3	1,43	7,87		WS	0,041	0,00	0,09	0,02	40,86
	DJ	18,53	16,0	21,6	1,03	5,57		DJ	0,098	0,02	0,20	0,03	30,48
	DU	18,35	15,3	21,6	1,35	7,37		DU	0,101	0,03	0,21	0,04	34,84
	TW	20,89	18,0	24,6	0,88	4,22		TW	0,058	0,02	0,53	0,03	56,18
	DCW	18,38	15,6	21,6	1,24	6,77		DCW	0,095	0,02	0,22	0,04	38,06
6	DZ	3,43	1,0	6,0	0,91	26,63	13	DZ	0,076	0,03	0,15	0,02	29,69
	WS	3,49	1,0	6,0	0,79	22,66		WS	0,070	0,01	0,16	0,03	41,49
	DJ	3,89	3,0	6,0	0,73	18,82		DJ	0,173	0,04	0,35	0,05	31,56
	DU	3,90	2,0	7,0	0,77	19,68		DU	0,171	0,05	0,39	0,06	37,38
	TW	4,13	2,0	7,0	1,00	24,32		TW	0,104	0,03	0,86	0,06	53,51
	DCW	4,11	3,0	7,0	0,67	16,40		DCW	0,095	0,02	0,22	0,04	38,06
7	DZ	22,24	14,3	31,0	3,13	14,06		DZ					
	WS	22,73	11,9	33,4	3,32	14,59		WS					
	DJ	25,95	14,3	38,2	4,18	16,10		DJ					
	DU	23,23	11,9	33,4	3,34	14,36		DU					
	TW	20,84	14,3	28,7	2,80	13,44		TW					
	DCW	23,94	14,3	35,8	3,12	13,05		DCW					

dzy sobą za wyjątkiem populacji z Doliny Chochołowskiej Wyżniej (DCW), która nie różni się od populacji z Długiego Uplazu (DU) i Dziurawego (DZ) oraz populacji z Wielkiej Świstówki (WS), która z kolei nie różni się od populacji z Doliny Jarząbcej (DJ). Liczba aparatów szparkowych na 2 mm długości po wypukłej stronie igły (#4) różnicuje prawie wszystkie populacje za wyjątkiem populacji z Długiego Uplazu (DU) i Doliny Chochołowskiej Wyżniej (DCW) oraz Dziurawego (DZ) i Doliny Jarząbcej (DJ). Pod względem liczby aparatów szparkowych na 2 mm długości po płaskiej stronie igły (#5), od pozostałych populacji najbardziej różni się populacja z Trzydniwiańskiego Wierchu (TW), która ma największą wartość tej cechy. Dodatkowo odróżnia się populacja z Dziurawego (DZ) od populacji z Doliny Chochołowskiej Wyżniej (DCW), Doliny Jarząbcej (DJ) i Dziurawego (DU). W populacji DZ jest najmniej aparatów szparkowych na 2 mm długości po płaskiej stronie igły (tab. 2). Z kolei liczba kanałów żywicznych na przekroju poprzecznym (#6) różni tylko populacje z Wielkiej Świstówki (WS) i Dziurawego (DZ) od Doliny Chochołowskiej Wyżniej (DCW) i Trzydniwiańskiego Wierchu (TW). Populacje WS i DZ mają najmniej kanałów żywicznych (tab. 2). Wysokość komórek epidermy (#7) najbardziej odróżnia DJ od pozostałych populacji oraz populacje TW od DCW, WS i DU a także DZ od DCW. Populacja DJ miała najwyższe komórki epidermy, a TW najniższe (tab. 2); DJ odróżnia się również od pozostałych populacji najszerszymi komórkami epidermy (#8); nie różniąc się tylko od populacji z DCW. Nie różnią się również

populacje: DZ od TW i WS oraz WS od TW i DCW od DU. Małe dysproporcje dotyczą także szerokości igły na przekroju poprzecznym (#9), która odróżnia tylko WS od populacji DU i DJ. Igły kosodrzewiny z WS są najwęższe (tab. 2). Wysokość igły na przekroju poprzecznym (#10) różni tylko DU od DZ, TW i WS oraz WS od DCW i DJ. Igły kosodrzewiny DU są najwyższe, natomiast z WS najniższe (tab. 2). Odległość pomiędzy wiązkami przewodzącymi (#11) jest największa również u populacji DU (tab. 2) i najbardziej odróżnia tę populację od pozostałych, za wyjątkiem populacji DCW. Poza tym cechą tą różni się jeszcze populacja TW od populacji DCW i WS. Iloraz wysokości do szerokości igły (#12) różni większość populacji między sobą za wyjątkiem DZ i TW oraz WS, a także DCW oraz DJ i DU, jak również DU i DJ. Podobnie wskaźnik Marcet'a (#13) nie różni tylko DCW od TW, WS i DZ oraz DZ od WS i DU od DJ.

Z analizy wariancji (ANOVA) wynika, że największy wpływ na zróżnicowanie populacji miały cechy dotyczące liczby aparatów szparkowych: liczba rzędów aparatów szparkowych na płaskiej stronie igły (#2, $F=204,99$; $p<0,001$), liczba aparatów szparkowych na 2 mm długości po wypukłej stronie igły (#4, $F=121,02$; $p<0,001$) oraz liczba rzędów aparatów szparkowych na wypukłej stronie igły (#1, $F=110,21$; $p<0,001$). Należy dodać, że cechy te wykazywały pozytywną, średnią i dużą korelację z wysokością nad poziomem morza (tab. 4): dla cechy 2 $r=0,61$ ($p=0,198$), dla cechy 4 $r=0,41$ ($p=0,426$), a dla cechy 1 $r=0,72$ ($p=0,104$). Oznacza to, że wraz ze wzrostem wysokości nad poziomem

Tabela 3. Wynik testu Tukey'a pomiędzy sześcioma populacjami kosodrzewiny dla każdej cechy igieł osobno, * - wartość $p<0,001$, ** - wartość $p<0,01$, * - wartość $p<0,05$, ns - wartość $p>0,05$**

Table 3. Result of Turkey test between six populations of dwarf mountain pine for each needles trait separately. *** – $p<0.001$, ** – $p<0.01$, * – $p<0.05$, ns – $p>0.05$

	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ
DCW						
DJ	***					
TW	***	***				
WS	ns	***	***			
DU	ns	***	***	***		
DZ	ns	***	***	***	ns	

[1]

	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ
DCW						
DJ	***					
TW	***	***				
WS	ns	***	***			
DU	ns	***	***	ns		
DZ	ns	***	***	ns	ns	

[2]

	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ
DCW						
DJ	***					
TW	***	***				
WS	**	ns	***			
DU	ns	***	***	*		
DZ	ns	***	***	***		

[3]

	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ
DCW						
DJ	***					
TW	***	***				
WS	***	***	***			
DU	ns	***	***	***		
DZ	***	ns	***	*	***	

[4]

DCW [5]

DJ	ns					
TW	***	***				
WS	ns	ns	***			
DU	ns	ns	***	ns		
DZ	**	**	***	ns	*	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

DCW [6]

DJ	ns					
TW	ns	ns				
WS	**	ns	**			
DU	ns	ns	ns	ns		
DZ	***	ns	***	ns	ns	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

DCW [7]

DJ	*					
TW	***	***				
WS	ns	***	*			
DU	ns	***	***	ns		
DZ	**	***	ns	ns	ns	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

DCW [8]

DJ	ns					
TW	***	***				
WS	***	***	ns			
DU	ns	*	***	***		
DZ	***	***	ns	ns	***	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

DCW [9]

DJ	ns					
TW	ns	ns				
WS	ns	***	ns			
DU	ns	ns	ns	**		
DZ	ns	ns	ns	ns	ns	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

DCW [10]

DJ	ns					
TW	ns	ns				
WS	*	**	ns			
DU	ns	ns	**	***		
DZ	ns	ns	ns	ns	**	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

DCW [11]

DJ	ns					
TW	***	ns				
WS	ns	ns	*			
DU	ns	***	***	*		
DZ	ns	ns	ns	ns	***	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

DCW [12]

DJ	ns					
TW	***	***				
WS	***	***	*			
DU	ns	ns	***	***		
DZ	***	***	ns	ns	***	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

DCW [13]

DJ	***					
TW	ns	***				
WS	ns	***	**			
DU	***	ns	***	***		
DZ	ns	***	*	ns	***	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

Tabela 4. Współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy 13 cechami igieł a wysokością nad poziomem morza oraz rodzajem podłoża na jakim rosną badane populacje kosodrzewiny. ** – wartość $p < 0,01$, * – wartość $p < 0,05$

Table 4. Pearson correlation coefficients between 13 needle traits and altitude and substrata where growing studied populations of dwarf mountain pine. ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$

Cecha Trait	Korelacja z wysokością npm		Korelacja z rodzajem podłoża	
	Correlation with altitude		Correlation with substrata	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
1	0,7232	0,104	0,4711	0,346
2	0,6107	0,198	0,4283	0,397
3	-0,2711	0,603	-0,3348	0,517
4	0,4075	0,423	-0,0887	0,867
5	0,4070	0,423	0,5110	0,300
6	0,1432	0,787	0,9401**	0,005
7	-0,3183	0,539	0,3009	0,562
8	-0,2601	0,619	0,5457	0,263
9	0,4883	0,326	0,7346	0,096
10	0,0900	0,865	0,6859	0,133
11	-0,5817	0,226	0,1465	0,782
12	-0,0951	0,858	0,8352*	0,038
13	0,1175	0,825	0,7041	0,118

morza wzrastała liczba aparatów szparkowych co ma wpływ na intensywność oddychania i stanowią przejaw adaptacji do warunków panujących na dużych wysokościach, zwiększając szansę przetrwania osobników.

Duży wpływ na zróżnicowanie pomiędzy populacjami miały jeszcze dwie cechy dotyczące liczby aparatów szparkowych: iloraz rzędów z aparatami szparkowymi (#3, $F=47,04$; $p < 0,001$) i liczba aparatów szparkowych na 2 mm długości po płaskiej stronie igły (#5, $F=52,57$; $p < 0,001$) oraz cechy dotyczące kształtu igieł: iloraz wysokości do szerokości igły (#12, $F=47,15$; $p < 0,001$) i wskaźnik Marcet'a (#13, $F=49,18$; $p < 0,001$). Współczynnik zmienności dla cechy #12 i #13 był bardzo wysoki i wynosił odpowiednio $V=53,23\%$ i $V=54,19\%$ (tab. 2). Autorzy innych prac dotyczących kompleksu *P. mugo* również wskazują na wskaźnik Marcet'a jako najbardziej zmienny (Boratyńska i Pashkevich 2001; Boratyńska 2002, Bączkiewicz et al. 2005) oraz na liczbę kanałów żywicznych (#6) i odległość pomiędzy wiązkami przewodzącymi (#11). W prezentowanych badaniach współczynnik zmienności dla cechy #6 wynosił od 16,40 dla DCW do 26,63 dla DZ, natomiast dla cechy #11 był niski i wahał się od 5,63 dla DCW do 7,56 dla WS. Cechy #12 i #13 nie były skorelowane z wysokością nad poziomem morza (odpowiednio $r=-0,09$ i $r=0,12$), ale z rodzajem podłoża i tak dla #12 $r=0,83$ ($p=0,038$) i dla

#13 $r=0,70$ ($p=0,118$) (tab. 4). Na uzyskany obraz zmienności mały wpływ miały natomiast: liczba kanałów żywicznych na przekroju poprzecznym (#6), szerokość igły na przekroju poprzecznym (#9) i wysokość igły na przekroju poprzecznym (#10). Wszystkie one były skorelowane z rodzajem podłoża (cecha 6: $r=0,94$ $p=0,005$; cecha 9: $r=0,73$ $p=0,096$ i cecha 10: $r=0,69$ $p=0,133$) (tab. 4). Cechy te miały większe wartości u populacji rosnących na podłożu granitowym niż na wapiennym (tab. 5). Podobny zestaw cech (#1, #3, #8, #9, #12 i #13) wpływających na zróżnicowanie populacji otrzymali Bączkiewicz et al. (2005) w pracy porównującej trzy populacje *P. mugo* z trzech różnych siedlisk. Przebadane populacje rosnące na podłożu wapiennym (Gładkie Upląziańskie), na torfowisku (Polana Waksmundzka) i na skale granitowej (Czarny Staw Gąsienicowy) różniły się od siebie statystycznie istotnie. Najbardziej odróżniała się od pozostałych populacja rosnąca na torfowisku, gdzie igły były największe, co wynikało z największej wilgotności podłoża w porównaniu z innymi siedliskami. W populacji rosnącej na podłożu wapiennym igły były bardziej spłaszczone niż w pozostałych populacjach, co również zostało wykryte w niniejszych badaniach. Inne cechy: szerokość igły na przekroju poprzecznym (#9) i wysokość (#10) igły na przekroju poprzecznym oraz iloraz wysokości do szerokości igły (#12) miały większe wartości w populacjach rosnących na podłożu granitowym (tab. 5). W badanej przez Bączkiewicz et al. (2005) populacji rosnącej na skale wapiennej wyższa była także liczba aparatów szparkowych, niż w populacji rosnącej na podłożu granitowym (ta miała ich najmniej). Podobne, lecz nie takie same wyniki uzyskano w obecnych badaniach. Populacje rosnące na podłożu wapiennym miały większe wartości dla ilorazu rzędów z aparatami szparkowymi (#3) i liczby aparatów szparkowych na 2 mm długości po wypukłej stronie igły (#4), ale mniej rzędów z aparatami szparkowymi po wypukłej i płaskiej stronie igły (#1, #2) oraz mniej aparatów szparkowych na 2 mm długości po płaskiej stronie igły (#5) (tab. 5). Liczba rzędów aparatów szparkowych na stronie wypukłej igły (#1) często jest wskazywana jako dyskryminacyjna i różnicująca populacje również dla *P. sylvestris* (m. in.: Bobowicz i Korczyk 1994; 2000; Urbaniak 2003).

W innych badaniach opisujących zmienność *P. mugo* wyrażoną w cechach morfologicznych i anatomicznych igieł stwierdzono, że cechami, które najbardziej różniły populacje były: długość igły (nie badana w tym opracowaniu) (Bączkiewicz 1995), szerokość oraz iloraz szerokości do wysokości komórek epidermy (Boratyńska, Pashkevich 2001; Boratyńska 2002; Boratyńska et al. 2004) oraz szerokość (#9) i wysokość (#10) igły na przekroju poprzecznym (Boratyńska et al. 2004). W prezentowanych tu badaniach, dwie populacje różnią się od pozostałych szerokością i wysokością igły (największe wartości), mianowicie Dolina Jarzębca, a szczególnie Długi Uplaz. Te dwie populacje rosną na podłożu granitowym oraz na podobnej (pośredniej) wysokości nad poziomem morza. Ponadto cechy te były ze sobą silnie skorelowane. Wartość współczynnika korelacji Pearsona pomiędzy szerokością (#9) a wysokością igły (#10) wynosiła

Tabela 5. Wynik testu t-Studenta pomiędzy populacjami kosodrzewiny rosnącymi na podłożu granitowym (G) i wapiennym (W). * – wartość $p < 0,001$, ns – wartość $p > 0,05$**

Table 5. The result of Student t-test between dwarf mountain pine populations which growing on granite (G) and limestone (W) substrata. *** – $p < 0.001$, ns – $p > 0.05$

Cecha Trait	Średnia dla G Mean for G	Średnia dla W Mean for W	Wartość testu t Student's t-test value	War- tość p p-value
1	10,484	9,018	6,23	***
2	8,419	6,802	5,91	***
3	1,275	1,343	-3,56	***
4	18,505	18,782	-1,02	ns
5	19,054	17,917	5,90	***
6	4,012	3,460	5,30	***
7	21,278	22,487	-1,83	ns
8	16,125	12,408	6,09	***
9	1,325	1,264	3,79	***
10	0,767	0,727	3,92	***
11	0,580	0,576	0,91	ns
12	0,088	0,042	10,92	***
13	0,136	0,073	8,56	***

w badanych populacjach od 0,85 do 0,91 i były to wartości statystycznie istotne ($p < 0,001$). Podobny wynik uzyskały Boratyńska i Bobowicz (2000) u *Pinus uncinata* z Pirenejów oraz Boratyńska (2002) u *Pinus mugo* z Tatr Zachodnich. W pracy Bączkiewicz et al. (2005) dotyczącej badań *P. mugo* z Tatr takiej zależności nie wykryto. Wysokość i szerokość igieł kosodrzewiny z Tatr Zachodnich badanej przez Boratyńską (2002) jest większa niż analizowanej w tym opracowaniu, natomiast wartości tych dwóch cech są podobne do ukraińskich populacji kosodrzewiny (Boratyńska, Pashkevich 2001).

Porównując jako całość populacje rosnące na podłożach granitowych i wapiennych (tab. 5) można zauważyć, że tylko wartości 3 cech z 13 są większe dla populacji występujących na podłożu wapiennym. Są to: iloraz rzędów z aparatami szparkowymi (#3), liczba aparatów szparkowych na 2 mm na wypukłej stronie igły (#4), oraz wysokość komórki epidermy (#7). Jednak na podstawie testu t-Studenta można stwierdzić, że dla cechy #4 i #7 nie były to różnice statystycznie istotne (tab. 5). Z kolei wśród pozostałych 10 badanych cech różnice pomiędzy populacjami rosnącymi na podłożu granitowym i wapiennym były statystycznie istotne ($p < 0,001$), za wyjątkiem odległości pomiędzy wiązkami przewodzącymi (#11). Cecha ta odznaczała się najniższą zmiennością spośród badanych cech (wartość V od 5,65 do 7,56%) (tab. 2),

czego nie potwierdzają badania innych autorów na *P. mugo* z Tatr Zachodnich i Ukrainy (Boratyńska, Pashkevich 2001; Boratyńska 2002).

4. Wnioski

1. Badane populacje różniły się statystycznie istotnie pod względem analizowanych cech.

2. Najbardziej odrębna okazała się populacja z Trzydniowiańskiego Wierchu, rosnąca na podłożu granitowym na wysokości 1600–1650 m n.p.m. Charakteryzowała się ona największą liczbą i największym zagęszczeniem aparatów szparkowych oraz najmniejszymi komórkami epidermy.

3. Najbardziej podobne do siebie były populacje: Wielka Świstówka oraz Dziurawe, które rosły na podłożu wapiennym w bliskiej geograficznie odległości od siebie. Na podobieństwo tych populacji mogą mieć wpływ warunki siedliskowe, a przede wszystkim przepływ genów między populacjami.

4. Populacje rosnące na podłożu granitowym wykazywały większe wartości 10 spośród 13 analizowanych cech. Na uzyskany obraz zmienności badanych populacji może jednak w większym stopniu mieć wpływ wysokość występowania nad poziomem morza aniżeli podłoże, na którym rosną osobniki. Populacje rosnące na większych wysokościach charakteryzowały się wyższymi wartościami cech dotyczących aparatów szparkowych. Cechy te mogą być wyrazem adaptacji roślin do egzystowania na dużych wysokościach.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować pani Izabeli Freitag za pomoc techniczną w czasie wykonywania badań.

Literatura

- Bączkiewicz A. 1995. Biometrical study of some individuals chosen from *Pinus mugo* Turra population in peat bog "Bór na Czerwonym". *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 1: 71–80.
- Bączkiewicz A., Prus-Głowacki W. 1997. Variability of *Pinus mugo* clones from Ostry Wierch peat bog. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66, 1: 79–82.
- Bączkiewicz A., Prus-Głowacki W. 2005. Morphological and anatomical variability of isozymatically indentified clones of *Pinus mugo* Turra. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47(2): 33–40.
- Bączkiewicz A., Buczkowska K., Wachowiak W. 2005. Anatomical and morphological variability of needles of *Pinus mugo* Turra on different substrata in the Tatra Mountains. *Biological Letters* 42(1): 21–32.
- Bobowicz M. A., Korczyk A. F. 1994. Interpopulation variability of *Pinus sylvestris* L. in eight Polish populations expressed in morphological and anatomical traits of needles. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 63: 67–76.

- Bobowicz M. A., Korczyk A. F. 2000. The variability of the oldest trees of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Białowieża Primeval Forest. II. Individual of needle morphology traits in old-growth Scots pine trees from the Białowieża Primeval Forest as a compared to the variability in eight Polish populations. *Biological Bulletin of Poznań* 37: 5–15.
- Bobowicz M. A., Krzakowa M. 1986. Anatomical differences between *Pinus mugo* Turra populations from the Tatra Mts. expressed in needle traits and in needle and cone traits together. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 55(2): 275–290.
- Boratyńska K. 2002. Needle variability of *Pinus mugo* Turra in the West Tatra Mts. *Dendrobiology* 48: 3–8.
- Boratyńska K., Bobowicz M. A. 2000. Variability of *Pinus uncinata* Ramond ex DC as expressed in needle traits. *Dendrobiology* 45: 7–16.
- Boratyńska K., Bobowicz M. A. 2001. *Pinus uncinata* Ramond taxonomy based on needle characters. *Plant Systematic and Evolution* 227: 183–194.
- Boratyńska K., Pashkevich N. A. 2001. Variability in needle traits of *Pinus mugo* Turra in the Ukrainian Carpathians. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 3: 181–186.
- Boratyńska K., Jasińska A. K., Boratyński A. 2015. Taxonomic and geographic differentiation of *Pinus mugo* complex on the needle characteristics. *Systematics and Biodiversity*. DOI:10.1080/14772000.2015.1058300.
- Boratyńska K., Marcysiak K., Boratyński A. 2005. *Pinus mugo* (Pinaceae) in the Abruzzi Mountains: high morphological variation in isolated populations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 309–316.
- Boratyńska K., Muchewicz E., Drojma M. 2004. *Pinus mugo* Turra geographic differentiation based on needle characters. *Dendrobiology* 51: 9–17.
- Boratyńska K., Działuk A., Lewandowski A., Marcysiak K., Jasińska A. K., Sobierajska K., Tomaszewski D., Burczyk J., Boratyński A. 2014. Geographic distribution of quantitative traits variation and genetic variability in natural populations of *Pinus mugo* in Central Europe. *Dendrobiology* 72:65–84. DOI: 10.12657/denbio.072.006.
- Christensen K. I. 1987a. Taxonomic revision of *Pinus mugo* complex and *P. x rhaetica* (*P. mugo* x *sylvestris*) (Pinaceae). *Nordic Journal of Botany* 7: 383–408.
- Christensen K. I. 1987b. Atypical cone and leaf character states in *Pinus mugo* Turra, *P. sylvestris* L., and *P. x rhaetica* Brügger (Pinaceae). *Gleditschia* 15(1): 1–5.
- Ferguson G. A., Takane Y. 2009. Analiza statystyczna w psychologii i pedagogice. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kmet' J., Lukáčik I., Tomanová S. 1994. Bioindication of the stress on needles of mountain pine (*Pinus mugo*) at different altitudes. *Acta Facultatis Forestalis Zvolen* 36: 41–50.
- Lukáčik I., Repáč I. 1992. Evaluation of growth of seedlings of Swiss mountain pine knee-pine (*Pinus mugo*) upon various substrata. *Acta Facultatis Forestalis Zvolen* 34: 127–135.
- Łomnicki A. 2014. Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Marcet E. 1967. Über den Nachweis spontaner Hybriden von *Pinus mugo* Turra und *Pinus sylvestris* L. auf Grund von Nadelmerkmalen. *Bericht der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft* 77: 314–361.
- Pawlaczyk E. M., Bobowicz M. A., Korczyk A. F. 2010. Variability of three natural populations of *Pinus sylvestris* L. from different sites of Białowieża Primeval Forest estimated using needle traits. *Forest Research Papers* 71(1): 83–92. DOI: 10.2478/v10111-010-0006-1.
- Piękoś-Mirkowa H., Mirek Z., Miechówka A. 1996. Endemic vascular plants in the Polish Tatra Mts. distribution and ecology. *Polish Botanical Studies* 12: 1–107.
- Staszkiwicz J. 1993. Variability of *Pinus mugo* x *Pinus sylvestris* (Pinaceae) hybrid swarm in the Tisovnica nature reserve (Slovakia). *Polish Botanical Studies* 5: 33–41.
- Triola M. F. 1998. Elementary statistics. Addison-Wesley Longman, Boston.
- Urbaniak L. 1998. Zróżnicowanie geograficzne sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z terenu Eurazji na podstawie cech anatomicznych i morfologicznych igieł. Wydawnictwo Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań. Ser. Biol. nr 58, p.142.
- Urbaniak L., Karliński L., Popielarz R. 2003. Variation of morphological needle characters of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in different habitats. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 72(1): 37–44.

Wkład autorów

E.M.P. – koncepcja badań, analiza statystyczna, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu; A.B. – koncepcja badań, zbiór materiału biologicznego, pomiar cech, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu; P.W. – opracowanie wyników, przegląd literatury, napisanie manuskryptu; M.C. – opracowanie wyników, przegląd literatury, napisanie manuskryptu; P.G. – pomiar cech, opracowanie wyników; K.B. – koncepcja badań, zbiór materiału biologicznego, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu.

Population differences in morphological and anatomical traits of *Pinus mugo* Turra needles from the Polish part of the Tatra Mountains

Ewa M. Pawlaczyk*, Alina Bączkiewicz, Piotr Wawrzyniak, Magdalena Czolpińska,
Patrycja Gonera, Katarzyna Buczkowska-Chmielewska

Adam Mickiewicz University, Department of Genetics, ul. Umultowska 89, 61–614 Poznań, Poland

*Tel. +48 61 8295866, e-mail: ewapaw@amu.edu.pl

Abstract. The main aim of this study was to describe the variation between the populations of the dwarf mountain pine *Pinus mugo* Turra based on the morphological and anatomical traits of their needles, and to investigate the relationship between the observed variation and environmental conditions (altitude and substrate). Two-year-old needles were collected from 180 individuals of six populations of *P. mugo* growing in the Tatra Mts. Two populations were classified as dense, located at 1360–1450 m altitude, and the remaining four formed loose clusters and were situated at 1500–1650 m altitude. Four of the populations are growing on granite and two on a limestone substrate. The natural variation of 10 morpho-anatomical and 3 synthetic needle traits was measured. In addition to descriptive statistics, the analyses of variance (ANOVA) with a Tukey test and principal component analysis were computed. We also estimated Pearson correlation coefficients for the examined needle traits and altitude as well as substrate. Our results indicate that the *P. mugo* populations differ significantly with regard to the investigated traits for which the Trzydniowiański Wierch population was the most distinct. The observed pattern of variability is largely caused by differences in stomatal traits and these features are positive correlated with altitude. Additionally, populations growing on granite have larger values for most of the examined traits compared to populations growing on limestone.

Keywords: dwarf mountain pine, Tatra Mts., variability, needle, altitude, substrate

1. Introduction

In Poland, *Pinus mugo* Turra (dwarf mountain pine) occurs in the Tatra Mountains and Babia Góra massif, in the subalpine belt called the dwarf mountain pine belt, as well as in some lower parts of the mountains, but only within the oligotrophic peat bogs.

Both zones are characteristic of nutrient deficiencies, and therefore, they are inaccessible to many tree species. Dwarf mountain pine is classified as a pioneer species (Piękoś-Mirkowa et al. 1996), as it occupies the areas remote to other woody species. Large tolerance to prevailing habitat conditions makes the dwarf mountain pine exceptionally adaptable, so it grows both on alkaline soils (limestones, dolomites) and acidic soils (granites, peat bogs) (Christensen 1987a).

There are hardly any data available, as compared to those on *Pinus sylvestris*, describing the morphological variability of *P. mugo* from different sites of its occurrence (e.g., Bobowicz, Krzakowa 1986, Bączkiewicz, Głowacki 1997, 2005, Bączkiewicz et al. 2005, Boratyńska et al. 2015). Most of the studies on dwarf mountain pine have referred to the natural hybrids of *P. mugo* and *P. sylvestris* (e.g., Staszkiwicz 1993; Bączkiewicz 1995; Boratyńska, Bobowicz 2000, 2001) – by and large focusing on the species' differences and not comparing the variability of populations from different growth environments. As has been shown in previous studies on conifers, the morphological differences are the response to various environmental conditions (Lukáčik, Repáč 1992; Kmeť et al. 1994; Bączkiewicz et al. 2005; Urbaniak 1998; Urbaniak et al. 2003, Pawlaczyk et al. 2010). In the case of dwarf mountain pine, these differences may be caused

Submitted: 3.03.2016, reviewed: 9.03.2016, accepted after revision: 10.10.2016

by natural geographic barriers that occur in the mountains, leading to isolation of populations, or else – climatic factors related to the gradient of altitude. So far, it has not been evidently determined if the morphological differences are caused due to ecological factors or are related to the climatic conditions associated with the height above sea level.

The aim of present study was to compare the levels of morphological and anatomical variability in the needles of *P. mugo* growing on different substrates (limestone, granite), with respect to the gradient of elevation above sea level.

2. Material and methods

Plant material

The study material was the needles of two-year-old dwarf mountain pine (*Pinus mugo*), collected from six populations growing in the Tatra Mts. (Fig.1). The two populations tested were located at the altitude of 1360 m–1450 m above sea level (valleys: Wielka Świstówka and Chochołowska Wyżnia), which is below the *P. mugo* altitudinal zone. Four more populations tested were at the height of 1500–1650 m a.s.l., that is, within the species altitudinal zone (in the valleys: Jarzabcza, Chochołowska Wyżnia, Długi Uplaz ridge and Trzydniowiański Wierch peak). The plants tested grew on limestone (1360 m–1450 m a.s.l.) and granite rocks (1500 m–1650 m ASL).

The samples were collected randomly from 30 specimens from each population in the designated transects at every 20 m. The method of harvesting the plant material was the same as described in detail by Boratyńska and Bobowicz (2000, 2001) and Boratyńska and Boratyński (2003). The collected

needles were stored in 70% ethanol until the analyses began. There were 10 analysed needles for each specimen. In total, 1800 needles from 180 specimens were examined.

Biometric methods

Each needle was examined with regard to 10 morphological and anatomical traits as well as 3 conversion traits (Table 1). In order to measure the anatomical traits of the needles, cross-cut sections were prepared at halfway down the length of the needle. The cross-cut sections obtained were fixed by immersing them in polyvinyl alcohol. Olympus camera images were taken under a light microscope and needle traits were measured using Cell B software (Olympus Corporation).

Statistical methods

The obtained biometric data was statistically analysed using Statistica v. 12.0 (StatSoft PL). The calculated measures were: the arithmetic mean, the minimum and maximum values, standard deviation and coefficient of variation (Ferguson, Takane 2009) and coefficients of correlation between traits and altitude (Łomnicki 2014). Furthermore, one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test, Student's t-test (Triola 1998), principal component analysis (PCA) were performed, the Mahalanobis distances were determined and a dendrogram was constructed using the Euclidean distance. Prior to performing the calculations, the normality of the distribution of tested traits in individual populations was tested with Shapiro-Wilk test and Levene's homogeneity of variance. The affirmative answer allowed for parametric tests.

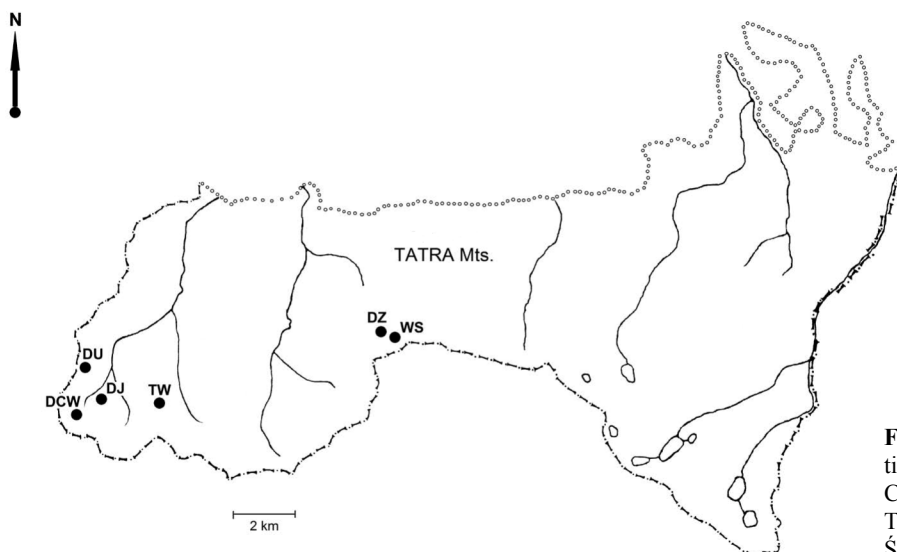
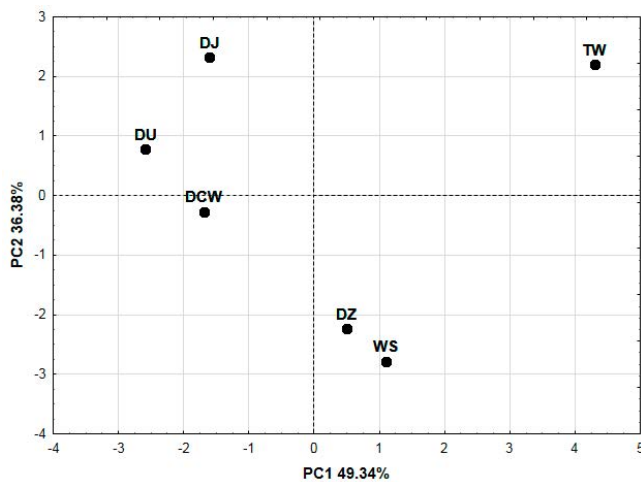
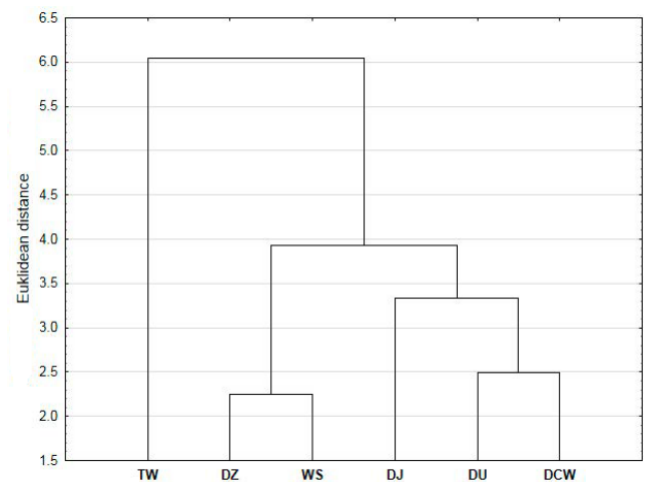


Figure 1. The localities of six studied populations in the Tatra Mts. Symbols: DCW – Dolina Chochołowska Wyżnia, DJ – Dolina Jarzabcza, TW – Trzydniowiański Wierch, WS – Wielka Świstówka, DU – Długi Uplaz, DZ – Dziurawe

Table 1. Studied needle traits of *Pinus mugo*

No.	Traits
1.	Number of stomata rows on convex (abaxial) side of needle
2.	Number of stomata rows on flat (adaxial) side of needle
3.	Stomata row index (trait 1/2)
4.	Mean number of stomata in a 2-mm-long section of convex (abaxial) side of needle
5.	Mean number of stomata in a 2-mm-long section of flat (adaxial) side of needle
6.	Number of resin canals on cross-section
7.	Height of epidermal cells in μm
8.	Width of epidermal cell in μm
9.	Needle width on cross-sections in μm
10.	Needle height on cross-sections in μm
11.	Distance between vascular bundles, in μm
12.	Needle height to needle width ratio (trait 10/9)
13.	Marcet's coefficient (trait 9 x 11 / 10) (Marcet 1967)

**Figure 2.** Principal component analysis (PCA) for six studied populations**Figure 3.** Dendrogram of six studied populations of dwarf mountain pine constructed based on the nearest neighborhood method

3. Results and Discussion

By analysing the differences between the populations, it was concluded that the greatest distinctiveness was shown by the dwarf mountain pine population growing on the slope of Trzydniowiński Wierch (TW). This was confirmed by the calculated Mahalanobis distances between populations, PCA results (Fig. 2) and the dendrogram based on Euclidean shortest distances (Fig. 3). TW population grows on granite bedrock, at an altitude of 1600 m–1650 m a.s.l. Of the 13 examined traits,

6 had the highest means as compared to those obtained in other populations tested, whereas the means obtained for 4 traits were comparatively the lowest (Table 2). The first group (the highest means) includes traits describing the stomatal density in the needles, that is, the number of stomata rows on the flat and convex sides of the needle (#1 and #2), and the number of stomata on 2 mm long flat or convex sides of the needle (#4 and #5). The obtained values were higher than the results of the authors who studied the dwarf mountain pine in the Western Tatras (Boratynska 2002), and higher than those obtained in

the Ukrainian populations (Boratyńska, Pashkevich 2001). In comparison to the rest of the populations examined in the present study, the above traits showed the highest maximum values (16, 15, 24.6 and 24.6) as well as the minimum values (8, 7, 19.6 and 18), and were characterized by a small variability (Table 2). In addition to the first group, there belonged the trait: the number of resin channels on needle cross-section (#6); unlike the traits described above, this one was characterized by a large variability (Table 2). The second group of traits, formed due to the fact that TW population showed the lowest mean values with regard to these traits, when compared with rest of the dwarf mountain pine populations tested, was the quotient of the stomata rows (stomata row index #3), that is, the ratio of the numbers of rows observed on the needle convex and flat parts (#1/#2). In TW population, the index mean was 1.1, indicating that the numbers of the rows on both sides of the needle are analogous, whereas in the rest of populations tested, the number of stomata rows was significantly higher on the convex side of the needle (Table 2). The next two traits with low values, observed in TW population, were the height and width of the epidermal cells (#7 and #8). In this case, the needle epidermis was thin and built of fine cells (20.84 μm and 11.80 μm , respectively). The distance between the vascular bundles (#11) in TW population was also the smallest and ranged from 0.470 mm to 0.651 mm (on average – 0.562 mm), but not significantly different from other populations (Table 2). To sum up, as compared to the other studied dwarf mountain pine populations, the population from Trzydniowiański Wierch (TW) was characterized by the largest number of stomata in the needles and the thinnest needle epidermis.

Dwarf mountain pine population growing at an altitude of 1400 m in the Chochołowska Wyzna Valley (DCW), was the most different from TW population. The Mahalanobis distance between these two populations was 11.94. In contrast to TW population, in DCW population, the number of stomata on the convex and flat needle sides (#1, #2, #4, #5) was one of the lowest. On the other hand, when compared to TW, needle epidermis (#7 and #8) in DCW was much thicker (Table 2). DCW population showed the greatest similarity to dwarf mountain pine population growing at 1500 m a.s.l. – on the slope of Długi Uplaz ridge (DU) (Figs. 2 and 3). DCW and DU populations were characterized by a relatively small number of stomata on both sides of the needle (#1, #2, #4, #5), the significant difference between the number of stomata rows on the convex and flat (#3) sides, broad epidermal cells (#8) and high (thick) needles (#10, #11, #12) (Table 2). Similar to the TW population, DCW and DU populations grew on granite bedrock, but DU population grew over 100 m higher than DCW and 100 m lower than TW, which could influence the manner of development of some traits.

As proved by PCA results (Fig. 2) and presented in the dendrogram (Fig. 3), of all the dwarf mountain pine

populations examined, the populations from Wielka Świstówka (WS) and Dziurawe (DZ) were most similar. The Mahalanobis distance between WS and DZ was 2.21. Both populations grew on limestone bedrock, close to each other geographically (Fig. 1), but at different altitudes (WS at 1360 m–1450 m and DZ at 1600 m–1630 m). In WS and DZ populations, the variability of majority of traits (#1, #2, #4, #5, #6, #7, #8, #12 and #13) was at similar levels (Table 2). Both populations were characterized by a low number of stomata on both sides of the needles. WS population showed the lowest number of stomata on the convex side of the needle (#1) (8.51), as compared to the rest of populations studied and DZ population, the lowest number of stomata on 2 mm long needle flat side (#5) (17.68) (Table 2). DZ and WS populations were also characterized by the lowest number of resin channels in cross-section (#6; 3.43 and 3.49 respectively), flat needles (#12; 0.044 mm and 0.041 mm, respectively), and they also showed low values of Marcet's coefficient (#13; 0.076 and 0.070, respectively) (Table 2). Flat needles in dwarf mountain pine population growing on limestone is the trait noted also by Bączkiewicz et al. (2005). However, in the latter study, unlike in the populations described in the present paper, the needles from *P. mugo* population growing on limestone bedrock had more stomata, when compared to the needles from population growing on granite bedrock. Similarity of the two investigated populations (WS and DZ) could be influenced not only by similar ecological conditions, but also by the small geographic distance that favoured the exchange of genes between these populations.

The last studied population was from the Jarzabcza Valley (DJ) growing on granite bedrock at an altitude of 1530 m–1580 m above sea level and it showed: the largest needle width on cross-section (#9; 1.3624 mm), the highest Marcet's coefficient (#13; 0.173) and the widest and tallest cells of the epidermis (#7 and #8; 25.95 μm and 15.24 μm , respectively) (Table 2). The epidermal cells of this population were larger than those of the remaining populations tested, and slightly larger than those of the Ukrainian population (on average $22.51 \pm 14.29 \mu\text{m}$) (Boratyńska, Pashkevich 2001), but more flattened than those observed in the Western Tatras (27.45 μm) (Boratyńska 2002). On the dendrogram, the DJ population is intermediate between the populations growing on limestone (DZ, WS) and granite (DU and DCW) (Figs. 2 and 3). The similarity of DJ population to those growing on limestone bedrock was due to 3 traits: the number of stomata rows on the convex and flat sides of the needle (#1, #2), and the number of stomata within 2 mm long convex side of the needle (#4). DJ similarity to DU and DCW populations was attributable to 5 traits: the number of stomata on 2 mm long flat side of the needle (#5), the number of resin channels on cross-section (#6), the width of epidermal cells (#8), the width of needle on cross-section (#9) and the needle height on cross-section (#10).

Table 2. Descriptive statistics of 13 needle traits for studied six populations of dwarf mountain pine. Symbols: M – arithmetic mean, Min – minimal value, Max – maximal value, SD – standard deviation, V% – coefficient of variability

Trait	Population	M	Min	Max	SD	V%	Trait	Population	M	Min	Max	SD	V%
1	DZ	9.52	5.0	12.0	1.24	13.01	8	DZ	12.31	7.2	19.1	2.06	16.70
	WS	8.51	5.0	12.0	1.29	15.17		WS	12.50	4.8	19.1	2.43	19.47
	DJ	10.66	7.0	14.0	1.07	10.06		DJ	15.24	9.6	23.9	2.43	15.93
	DU	9.45	6.0	12.0	1.38	14.61		DU	14.10	9.6	19.1	2.00	14.15
	TW	12.83	8.0	16.0	1.25	9.76		TW	11.80	7.2	16.7	2.06	17.48
	DCW	8.88	6.0	11.0	1.10	12.40		DCW	14.17	9.6	19.1	2.14	15.18
2	DZ	6.94	5.0	11.0	1.09	15.67	9	DZ	1.2934	1.056	1.632	0.10	7.85
	WS	6.66	4.0	9.0	1.10	16.51		WS	1.2347	0.960	1.670	0.11	8.96
	DJ	8.50	6.0	11.0	1.12	13.17		DJ	1.3624	1.152	1.670	0.10	7.46
	DU	7.03	5.0	11.0	1.31	18.56		DU	1.3317	1.018	1.632	0.14	10.43
	TW	11.51	7.0	15.0	1.35	11.69		TW	1.3062	1.075	1.594	0.11	8.10
	DCW	6.53	5.0	10.0	1.01	15.50		DCW	1.2989	1.018	1.651	0.11	8.43
3	DZ	1.40	0.8	4.1	0.27	19.15	10	DZ	0.7398	0.595	0.979	0.07	8.91
	WS	1.29	0.8	2.0	0.20	15.15		WS	0.7151	0.576	0.902	0.08	10.50
	DJ	1.25	1.0	1.7	0.16	12.57		DJ	0.7779	0.557	0.941	0.07	8.52
	DU	1.36	1.0	2.0	0.18	13.38		DU	0.7942	0.595	1.344	0.08	10.31
	TW	1.12	0.9	1.4	0.09	8.24		TW	0.7336	0.576	0.922	0.06	8.44
	DCW	1.37	0.9	2.0	0.19	13.94		DCW	0.7610	0.614	0.998	0.06	8.23
4	DZ	18.44	14.0	21.6	1.45	7.87	11	DZ	0.5725	0.494	0.705	0.03	5.83
	WS	19.12	15.3	22.0	1.43	7.49		WS	0.5799	0.436	0.811	0.04	7.56
	DJ	18.24	15.3	21.6	0.97	5.30		DJ	0.5717	0.468	0.746	0.04	6.58
	DU	16.99	14.3	20.0	1.21	7.11		DU	0.5980	0.481	0.875	0.04	7.05
	TW	21.57	19.6	24.6	0.94	4.37		TW	0.5625	0.470	0.651	0.03	6.09
	DCW	17.18	14.6	20.6	1.16	6.76		DCW	0.5869	0.494	0.717	0.03	5.65
5	DZ	17.68	13.0	20.6	1.25	7.08	12	DZ	0.044	0.02	0.07	0.01	28.97
	WS	18.16	14.6	21.3	1.43	7.87		WS	0.041	0.00	0.09	0.02	40.86
	DJ	18.53	16.0	21.6	1.03	5.57		DJ	0.098	0.02	0.20	0.03	30.48
	DU	18.35	15.3	21.6	1.35	7.37		DU	0.101	0.03	0.21	0.04	34.84
	TW	20.89	18.0	24.6	0.88	4.22		TW	0.058	0.02	0.53	0.03	56.18
	DCW	18.38	15.6	21.6	1.24	6.77		DCW	0.095	0.02	0.22	0.04	38.06
6	DZ	3.43	1.0	6.0	0.91	26.63	13	DZ	0.076	0.03	0.15	0.02	29.69
	WS	3.49	1.0	6.0	0.79	22.66		WS	0.070	0.01	0.16	0.03	41.49
	DJ	3.89	3.0	6.0	0.73	18.82		DJ	0.173	0.04	0.35	0.05	31.56
	DU	3.90	2.0	7.0	0.77	19.68		DU	0.171	0.05	0.39	0.06	37.38
	TW	4.13	2.0	7.0	1.00	24.32		TW	0.104	0.03	0.86	0.06	53.51
	DCW	4.11	3.0	7.0	0.67	16.40		DCW	0.095	0.02	0.22	0.04	38.06
7	DZ	22.24	14.3	31.0	3.13	14.06		DZ					
	WS	22.73	11.9	33.4	3.32	14.59		WS					
	DJ	25.95	14.3	38.2	4.18	16.10		DJ					
	DU	23.23	11.9	33.4	3.34	14.36		DU					
	TW	20.84	14.3	28.7	2.80	13.44		TW					
	DCW	23.94	14.3	35.8	3.12	13.05		DCW					

Based on the above description, it can be concluded that the studied populations are characterized by a high degree of distinctiveness. This is confirmed by the calculated Mahalanobis distances, which are significantly important between all the studied populations ($p < 0.001$), as well as the results of ANOVA and Tukey’s test.

The results of Tukey’s test show which populations differ in terms of each of the 13 needle traits tested. And so, in terms of the number of stomata on the convex side of the needle (#1), all populations differ from each other except for the population from the Chochołowska Wyżna Valley (DCW), which is not different from those from Wielka Świstówka (WS), Długi Uplaz (DU) and Dziurawe (DZ). Additionally, the DU population is not different than the DZ population. The numbers of stomata rows on the flat side of the needle (#2) are most distinctive in the dwarf mountain pine populations from Trzydniowiński Wierch (TW) and the Jarzącza Valley (DJ), when compared to the rest of the populations tested (these show no differences in terms of trait #2). TW and DJ populations show the highest values of traits #1 and #2 (Table 2). With regard to the stomata row index (#3), almost all populations differ from each other, except for DCW population, which is not different from DU and DZ populations as well as WS population, which is not different from DJ population. The number of stomata per 2 mm long convex side of the needle (#4) differentiates nearly all populations, except for DU, DZ, WS and DJ. With respect to the number of stomata per 2 mm long flat side of the needle (#5), TW population is most different from other tested populations.

TW population shows the highest value of trait #5. Also, DZ population is different from DCW, DJ and DU populations in terms of this feature. In DZ population, the smallest number of stomata are observed on a 2 mm long flat side of the needle (Table 2). The numbers of resin channels in the cross-section (#6) are different only in WS and DZ populations, when compared to DCW population. The lowest numbers of resin channels are observed in the needles of WS and DZ populations (Table 2). The height of the epidermal cell (#7) distinguishes DJ from the rest of the populations, as well as TW population from DCW, WS and DU, and DZ from DCW. DJ population have the highest epidermal cells, and the lowest are observed in TW population (Table 2). At the same time, DJ population is distinctive with the widest cells of the epidermis (#8), as compared to the rest of the populations, not being different only from DCW population. In terms of trait #8, no differences are found between DZ population and TW and WS populations as well as between WS population and TW population, and between DCW and DU as well. Minor disparities apply to the width of the needle on cross-section (#9) as well, which distinguishes only WS from DU and DJ populations. Dwarf mountain pine needles in WS population are the narrowest when compared to other tested populations (Table 2). The height of the needle on cross-section (#10) differs only DU from DZ, TW and WS and WS from DCW and DJ. The needles are the highest in DU population, and those in WS population are the lowest (Table 2). The distance between the vascular bundles (#11) is the highest in DU population (Table 2), which distinguishes this population from the rest, except

Table 3. Result of Turkey test between six populations of dwarf mountain pine for each needles trait separately. *** – $p < 0.001$, ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$, ns – $p > 0.05$

	[1]						[2]					
DCW	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ
DJ	***						***					
TW	***	***					***	***				
WS	ns	***	***				ns	***	***			
DU	ns	***	***	***			ns	***	***	ns		
DZ	ns	***	***	***	ns		ns	***	***	ns	ns	

	[3]						[4]					
DCW	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ
DJ	***						***					
TW	***	***					***	***				
WS	**	ns	***				***	***	***			
DU	ns	***	***	*			ns	***	***	***		
DZ	ns	***	***	***			***	ns	***	*	***	

[5]

DCW						
DJ	ns					
TW	***	***				
WS	ns	ns	***			
DU	ns	ns	***	ns		
DZ	**	**	***	ns	*	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

[6]

DCW						
DJ	ns					
TW	ns	ns				
WS	**	ns	**			
DU	ns	ns	ns	ns		
DZ	***	ns	***	ns	ns	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

[7]

DCW						
DJ	*					
TW	***	***				
WS	ns	***	*			
DU	ns	***	***	ns		
DZ	**	***	ns	ns	ns	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

[8]

DCW						
DJ	ns					
TW	***	***				
WS	***	***	ns			
DU	ns	*	***	***		
DZ	***	***	ns	ns	***	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

[9]

DCW						
DJ	ns					
TW	ns	ns				
WS	ns	***	ns			
DU	ns	ns	ns	**		
DZ	ns	ns	ns	ns	ns	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

[10]

DCW						
DJ	ns					
TW	ns	ns				
WS	*	**	ns			
DU	ns	ns	**	***		
DZ	ns	ns	ns	ns	**	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

[11]

DCW						
DJ	ns					
TW	***	ns				
WS	ns	ns	*			
DU	ns	***	***	*		
DZ	ns	ns	ns	ns	***	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

[12]

DCW						
DJ	ns					
TW	***	***				
WS	***	***	*			
DU	ns	ns	***	***		
DZ	***	***	ns	ns	***	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

[13]

DCW						
DJ	***					
TW	ns	***				
WS	ns	***	**			
DU	***	ns	***	***		
DZ	ns	***	*	ns	***	
	DCW	DJ	TW	WS	DU	DZ

Table 4. Pearson correlation coefficients between 13 needle traits and altitude and substrata where growing studied populations of dwarf mountain pine. ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$

Trait	Correlation with altitude		Correlation with substrata	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
1	0.7232	0.104	0.4711	0.346
2	0.6107	0.198	0.4283	0.397
3	-0.2711	0.603	-0.3348	0.517
4	0.4075	0.423	-0.0887	0.867
5	0.4070	0.423	0.5110	0.300
6	0.1432	0.787	0.9401**	0.005
7	-0.3183	0.539	0.3009	0.562
8	-0.2601	0.619	0.5457	0.263
9	0.4883	0.326	0.7346	0.096
10	0.0900	0.865	0.6859	0.133
11	-0.5817	0.226	0.1465	0.782
12	-0.0951	0.858	0.8352*	0.038
13	0.1175	0.825	0.7041	0.118

for DCW population. Moreover, this feature is also different in TW population when compared to DCW and WS populations. The ratio of the needle height to width (#12) differentiates the populations tested, except for DZ and TW and WS; DCW and DJ and DU, as well as DU and DJ. Likewise, Marcet's coefficient (#13) does not differentiate DCW from TW, WS and DZ populations, DZ population from WS population and DU from DJ.

The analysis of variance (ANOVA) shows that traits associated with stomata had the highest effect on variability between the tested populations, that is, the number of stomata rows on the flat side of the needle (#2, $F = 204.99$; $p < 0.001$), the number of stomata on 2 mm long convex side of the needle (#4, $F = 121.02$; $p < 0.001$), and the number of stomata rows on the convex side of the needle (#1, $F = 110.21$, $p < 0.001$). It should be noted that these traits showed positive, medium and high correlations with the altitude (Table 4): for #2 - $r = 0.61$ ($p = 0.198$), for #4 - $r = 0.41$ ($p = 0.426$), and #1 - $r = 0.72$ ($p = 0.104$). This means that with the increasing height above sea level, the number of stomata in the needles increases, which influences the respiration intensity as adaptation to high altitude conditions, by improving the ability of individuals to endure.

Two more traits pertaining to stomata were much associated with the differences between dwarf mountain pine populations, that is, stomata row index (#3, $F=47.04$; $p<0.001$) and the number of stomata on 2 mm long flat side of the needle (#5, $F = 52.57$; $p < 0.001$). Other traits concerning needle shape were the

proportion of needle height to width (#12, $F = 47.15$; $p < 0.001$) as well as Marcet's coefficient (#13, $F = 49.18$; $p < 0.001$). The coefficients of variation for traits #12 and #13 were very high – $V = 53.23\%$ and $V = 54.19\%$, respectively (Table 2). The authors (Boratyńska, Pashkevich 2001; Boratyńska 2002, Bączkiewicz et al. 2005) of other studies on the *P. mugo* complex point to Marcet's coefficient is very variable same as the number of resin channels (#6) and the distance between vascular bundles (#11). In the present study, the coefficient of variation for trait #6 ranged from 16.40 for DCW to 26.63 for DZ, whereas for feature #11, it was low and ranged from 5.63 (DCW) to 7.56 (WS). Features #12 and #13 were not correlated with the altitude ($r = -0.09$ and $r = -0.2$, respectively), but correlated with bedrock type: #12, $r = 0.83$ ($p = 0.038$) and #13, $r = 0.70$ ($p = 0.118$) (Table 4). The variability observed was influenced by the number of resin channels on cross-section (#6), the needle width on cross-section (#9) and the needle height on cross-section (#10). All these were correlated with the type of bedrock (#6: $r = 0.94$, $p = 0.005$, #9: $r = 0.73$ $p = 0.096$ and #10: $r = 0.69$ $p = 0.133$) (Table 4). The traits achieved higher values in dwarf mountain pine populations growing on the granite bedrock, when compared to those on limestone bedrock (Table 5). A similar set of traits (#1, #3, #8, #9, #12 and #13) influencing *P. mugo* population variability was described by Bączkiewicz et al. (2005), in a study comparing 3 populations of *P. mugo* from 3 different sites. The studied populations, growing on limestone (locality: Gładkie Uplaziańskie), peat bog (Polana Waksmundzka) and on granite (Czarny Staw Gąsienicowy), differed significantly from each other. The most different from the rest was the population growing on peat bog, which had the largest needles as a result of the highest moisture content in its growing substrate, when compared to the other sites tested. In the population growing on limestone, the needles were more flattened than those in the rest of the populations tested, and this was also observed in the present study. Other traits, that is, needle width on cross-section (#9) and needle height at cross-section (#10), as well as height-to-width ratio (#12), achieved higher values in populations growing on granite bedrock (Table 5). In the study by Bączkiewicz et al. (2005), the population growing on limestone rocks showed higher numbers of stomata as compared to the population growing on granite bedrock (with the lowest stomata numbers). Similar, but not the same results were obtained in the present study. The populations growing on limestone bedrock showed higher values for stomata row index (#3) and the number of stomata on 2 mm long convex side of the needle (#4), but fewer rows of stomata on the convex and flat side of the needle (#1, #2) and smaller stomata numbers on 2 mm long flat side of the needle (#5) (Table 5). The number of stomata rows on the convex side of the needle (#1) is often specified as the discriminating and differentiating trait for *P. sylvestris* (e.g., Bobowicz and Korczyk, 1994; Urbaniak 2003).

Table 5. The result of Student t-test between dwarf mountain pine populations which growing on granite (G) and limestone (W) substrata. *** – $p < 0.001$, ns – $p > 0.05$

Trait	Mean for G	Mean for W	Student's t-test value	p-value
1	10.484	9.018	6.23	***
2	8.419	6.802	5.91	***
3	1.275	1.343	-3.56	***
4	18.505	18.782	-1.02	ns
5	19.054	17.917	5.90	***
6	4.012	3.460	5.30	***
7	21.278	22.487	-1.83	ns
8	16.125	12.408	6.09	***
9	1.325	1.264	3.79	***
10	0.767	0.727	3.92	***
11	0.580	0.576	0.91	ns
12	0.088	0.042	10.92	***
13	0.136	0.073	8.56	***

In other studies describing the *P. mugo* variability expressed by the morphological and anatomical features of needles, it was found that the traits differentiating the population at the most were: needle length (not investigated in this study) (Bączkiewicz 1995), the width and width-height ratio in epidermal cells (Boratyńska et al. 2004) and the width (#9) and height (#10) of the needle on cross-section (Boratyńska et al. 2004). In the present study, 2 populations differed from rest of the tested populations with regard to needle width and height (achieving the highest values), namely, from the Jarzabcza Valley (DJ), and especially from the Długi Uplaz (DU). These two populations grow on granite bedrock and on similar (intermediate) elevations above sea level. In addition, the above traits were strongly correlated. In the studied populations, Pearson's correlation coefficient between the needle width (#9) and the height (#10) ranged from 0.85 to 0.91, and was statistically significant ($p < 0.001$). Similar results were obtained by Boratyńska and Bobowicz (2000) on *Pinus uncinata* from the Pyrenees, as well as by Boratyńska (2002) on *P. mugo* from the Western Tatras. In the work of Bączkiewicz et al. (2005) concerning *P. mugo* from the Tatras, such a relationship was not detected. The height and width of pine needles from the Western Tatras examined by Boratyńska (2002) were greater than those obtained in this study, but are similar to the values for these two traits observed in the Ukrainian dwarf mountain pine populations (Boratyńska, Pashkevich 2001).

Comparing the *P. mugo* populations growing on granite and limestone bedrocks as a whole (table 5), there can be seen that only the values of 3 traits from 13 are higher in the populations on limestone bedrock. These are stomata row index (#3), the number of stomata on 2 mm long convex side of the needle (#4) and the height of epidermal cells (#7). However, based on the Student's t-test, it can be concluded that for traits #4 and #7, the differences observed were not statistically significant (Table 5). With regard to the remaining 10 examined traits, the differences between populations growing on granite and limestone were statistically significant ($p < 0.001$), except for the distance between vascular bundles (#11). This trait was characterized by the lowest variability, when compared to all the examined traits (V ranged from 5.65% to 7.56%) (Table 2), which is not confirmed by other authors who studied *P. mugo* from the Western Tatras and Ukraine (Boratyńska, Pashkevich 2001; Boratyńska 2002).

4. Conclusions

1. The studied dwarf mountain pine populations differed significantly with regard to the analysed traits.
2. The most distinctive was the population from the Trzydniowiński Wierch, growing on the granite bedrock, at the altitude of 1600 m–1650 m a.s.l. It was characterized by the highest number and the highest density of stomata, as well as the smallest epidermal cells.
3. The most similar to each other were populations from Wielka Świstówka and Dziurawe, which grew on limestone bedrock in close proximity to each other. The similarity of these populations may be influenced by site conditions and, above all, the flow of genes between the populations.
4. The populations growing on granite bedrock exhibited higher values of 10 out of the 13 traits analysed. The observed variability of the studied populations may, however, be more influenced by the altitude of their occurrence than the bedrock type on which they grow. Populations growing at higher altitudes were characterized by the higher values of traits associated with stomata. These features may be an expression of adaptation of plants to high altitudes.

Conflict of interest

The Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements and source of funding

The Authors would like to thank Ms. Izabela Freitag for technical assistance during the study.

References

- Bączkiewicz A. 1995. Biometrical study of some individuals chosen from *Pinus mugo* Turra population in peat bog “Bór na Czerwonem”. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 1: 71–80.
- Bączkiewicz A., Prus-Głowacki W. 1997. Variability of *Pinus mugo* clones from Ostry Wierch peat bog. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66, 1: 79–82.
- Bączkiewicz A., Prus-Głowacki W. 2005. Morphological and anatomical variability of isozymatically identified clones of *Pinus mugo* Turra. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47(2): 33–40.
- Bączkiewicz A., Buczkowska K., Wachowiak W. 2005. Anatomical and morphological variability of needles of *Pinus mugo* Turra on different substrata in the Tatra Mountains. *Biological Letters* 42(1): 21–32.
- Bobowicz M. A., Korczyk A. F. 1994. Interpopulational variability of *Pinus sylvestris* L. in eight Polish populations expressed in morphological and anatomical traits of needles. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 63(1): 67–76.
- Bobowicz M. A., Korczyk A. F. 2000. The variability of the oldest trees of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Białowieża Primeval Forest. II. Individual of needle morphology traits in old-growth Scots pine trees from the Białowieża Primeval Forest as a compared to the variability in eight Polish populations. *Biological Bulletin of Poznań* 37: 5–15.
- Bobowicz M. A., Krzakowa M. 1986. Anatomical differences between *Pinus mugo* Turra populations from the Tatra Mts. expressed in needle traits and in needle and cone traits together. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 55(2): 275–290.
- Boratyńska K. 2002. Needle variability of *Pinus mugo* Turra in the West Tatra Mts. *Dendrobiology* 48: 3–8.
- Boratyńska K., Bobowicz M. A. 2000. Variability of *Pinus uncinata* Ramond ex DC as expressed in needle traits. *Dendrobiology* 45: 7–16.
- Boratyńska K., Bobowicz M. A. 2001. *Pinus uncinata* Ramond taxonomy based on needle characters. *Plant Systematic and Evolution* 227: 183–194.
- Boratyńska K., Pashkevich N. A. 2001. Variability in needle traits of *Pinus mugo* Turra in the Ukrainian Carpathians. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 3: 181–186.
- Boratyńska K., Jasińska A. K., Boratyński A. 2015. Taxonomic and geographic differentiation of *Pinus mugo* complex on the needle characteristics. *Systematics and Biodiversity*. DOI:10.1080/14772000.2015.1058300.
- Boratyńska K., Marcysiak K., Boratyński A. 2005. *Pinus mugo* (*Pinaceae*) in the Abruzzi Mountains: high morphological variation in isolated populations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 309–316.
- Boratyńska K., Muchewicz E., Drojma M. 2004. *Pinus mugo* Turra geographic differentiation based on needle characters. *Dendrobiology* 51: 9–17.
- Boratyńska K., Działuk A., Lewandowski A., Marcysiak K., Jasińska A. K., Sobierajska K., Tomaszewski D., Burczyk J., Boratyński A. 2014. Geographic distribution of quantitative traits variation and genetic variability in natural populations of *Pinus mugo* in Central Europe. *Dendrobiology* 72:65–84. DOI: 10.12657/denbio.072.006.
- Christensen K. I. 1987a. Taxonomic revision of *Pinus mugo* complex and *P. x rhaetica* (*P. mugo* x *sylvestris*) (*Pinaceae*). *Nordic Journal of Botany* 7: 383–408.
- Christensen K. I. 1987b. Atypical cone and leaf character states in *Pinus mugo* Turra, *P. sylvestris* L., and *P. x rhaetica* Brügger (*Pinaceae*). *Gleditschia* 15(1): 1–5.
- Ferguson G. A., Takane Y. 2009. Analiza statystyczna w psychologii i pedagogice. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kmet’ J., Lukáčik I., Tomanová S. 1994. Bioindication of the stress on needles of mountain pine (*Pinus mugo*) at different altitudes. *Acta Facultatis Forestalis Zvolen* 36: 41–50.
- Lukáčik I., Repáč I. 1992. Evaluation of growth of seedlings of Swiss mountain pine knee-pine (*Pinus mugo*) upon various substrata. *Acta Facultatis Forestalis Zvolen* 34: 127–135.
- Łomnicki A. 2014. Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Marcet E. 1967. Über den Nachweis spontaner Hybriden von *Pinus mugo* Turra und *Pinus sylvestris* L. auf Grund von Nadelmerkmalen. *Bericht der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft* 77: 314–361.
- Pawlaczyk E. M., Bobowicz M. A., Korczyk A. F. 2010. Variability of three natural populations of *Pinus sylvestris* L. from different sites of Białowieża Primeval Forest estimated using needle traits. *Forest Research Papers* 71(1): 83–92. DOI: 10.2478/v10111-010-0006-1.
- Piękoś-Mirkowa H., Mirek Z., Miechówka A. 1996. Endemic vascular plants in the Polish Tatra Mts. distribution and ecology. *Polish Botanical Studies* 12: 1–107.
- Staszkievicz J. 1993. Variability of *Pinus mugo* x *Pinus sylvestris* (*Pinaceae*) hybrid swarm in the Tisovnica nature reserve (Slovakia). *Polish Botanical Studies* 5: 33–41.
- Triola M. F. 1998. Elementary statistics. Addison-Wesley Longman, Boston.
- Urbaniak L. 1998. Zróżnicowanie geograficzne sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z terenu Eurazji na podstawie cech anatomicznych i morfologicznych igieł. Wydawnictwo Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań. Ser. Biol. nr 58, p.142.
- Urbaniak L., Karlinski L., Popielarz R. 2003. Variation of morphological needle characters of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in different habitats. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 72(1): 37–44.

Authors’ contribution

EMP – research concept, statistical analysis, development of the results, manuscript writing; AB – concept of research, collection of biological material, trait measurements, development of the results, manuscript writing; PW – preparation of results, literature review, manuscript writing; MC – preparation of the results, literature review, manuscript writing; PG – trait measurements, development of the results; KBC – research concept, collection of biological material, development of the results, manuscript writing.