

Józef Mítka¹, Ada Wróblewska², Wojciech Bąba³
Grzegorz Watrak¹, Marta Wątroba¹, Piotr Boroń⁴

Received: 12.03.2015

Reviewed: 30.06.2015

¹ Ogród Botaniczny, Instytut Botaniki, Uniwersytet Jagielloński
31–501 Kraków, ul. Kopernika 27
j.mítka@uj.edu.pl

² Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku
15–245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1J

³ Zakład Ekologii Roślin, Instytut Botaniki, Uniwersytet Jagielloński
31–512 Kraków, ul. Lubicz 24

⁴ Instytut Ochrony Ekosystemów Leśnych, Uniwersytet Rolniczy
31–425 Kraków, Al. 29 Listopada 46

POCHODZENIE *GALIUM SCHULTESII* I *STELLARIA HOLOSTEA* W BIESZCZADACH (KARPATY WSCHODNIE): REFUGIUM GLACJALNE CZY GENETYCZNY TYGIEL?

The origins of *Galium schultesii* and *Stellaria holostea* in the Bieszczady Mts (Eastern Carpathians): glacial refugium or genetic melting pot?

Abstract. The aim of the paper was to test the hypotheses on the genetic structure and origins of forest herbaceous plant species, *Galium schultesii* and *Stellaria holostea*, in the subalpine zone of the Bieszczady Mts. The species are generally the lowland elements occurred in fertile oak-hornbeam forests. Their extrazonal occurrence in the mountain subalpine zone could be an effect of recent, Holocene migrations from various glacial refugia or the surviving *in situ* the last glacial maximum (LGM) in cryptic forest refugia. The two hypotheses were tested with the use of AFLP genetic fingerprinting and the patterns of bands distribution were established based on General Linear Models (GLMs) and STRUCTURE analysis. Twenty nine populations of *G. schultesii* and thirty five population of *S. holostea* were sampled in the Carpathians, Transcarpathia, Pannonian Basin, Transilvania and Podolia. They were characterized by 200 and 219 AFLP loci, respectively. The Bieszczady's populations of both species, as a geographical group, were not divergent from the adjoining regions (Analysis of Molecular Variance AMOVA, $p > 0.05$). In *G. schultesii* a group of AFLP bands in three populations from the Bieszczady Mts. were found in Transcarpathia and the Piatra Craiului Mts (E Carpathians). In *S. holostea* a group of AFLP bands were found in four of the Bieszczady's populations, in the Eastern Romanian Carpathians (the Maramaros and Kelemen Mts.), and the Sandomierz Basin (Niepołomice Forest, north of W Carpathians). Both groups could have reflected a refugial pattern. The putative refugial vs. non-refugial groups had statistically significant between group variation (AMOVA) for both *G. schultesii* (4,8%, $p = 0.006$) and *S. holostea* (11,2%, $p < 0.001$). Statistical analysis showed that putative refugial group of *S. holostea* had statistically significantly lower indices of genetic richness FA ($p = 0.03$) and FA_{max} ($p = 0.01$), and higher divergence DW index ($p = 0.002$), in comparison to the non-refugial group. It could be an effect of the genetic bottleneck. *Galium schultesii* had significantly higher indices of genetic diversity: PPL ($p = 0.008$), Nei's h ($p = 0.037$), Shannon I (p

< 0.001), and divergence *DW* index ($p = 0.007$) in the putative refugial group. Probably both forest herbs could have persisted the LGM in the Bieszczady Mts.

Key words: herbaceous forest herbs, cryptic forest refugia, Eastern Carpathians, genetic melting pot, Holocene migrations, LGM, subalpine zone.

Wstęp

Ekstrazonalne występowanie niżowych gatunków łąkowych w obszarze górskim jest interesującym zjawiskiem przyrodniczym i wynika z czwartorzędowej historii zasięgów gatunków leśnych w Karpatach. Są to składniki roślinności strefy umiarkowanej i mogą być obiektem służącym do testowania hipotez dotyczących istnienia leśnych kryptorefugiów glacialnych w obszarze górskim. Przedstawione wyniki badań z wykorzystaniem analizy molekularnej DNA są pierwszymi dotyczącymi tego tematu z obszaru Karpat. Ich celem było określenie pochodzenia gatunków łąkowych na połoninach bieszczadzkich, na podstawie porównania zmienności wzorców AFLP w populacjach dwóch gatunków zielnych, typowych dla zbiorowiska lasu łąkowego w obszarze Karpat i krainach przyległych. Przyjęto dwie hipotezy wyjściowe. Pierwsza z nich zakłada młody, holocenijski wiek bieszczadzkiej populacji związanych z atlantyckim optimum klimatycznym. Druga hipoteza ich występowania ponad górną granicę lasu wiąże z faktem przeżycia ostatniego zlodowacenia *in situ*, czyli z hipotezą kryptorefugium glacialnego.

Obecność zielnych roślin lasu łąkowego na bieszczadzkich połoninach jest interesującym zagadnieniem biogeograficznym, które wzbudzało zainteresowanie przyrodników począwszy od pionierskich badań florystycznych Bolesława Kotuli i Eustachego Wołoszczaka, prowadzonych na tym obszarze pod koniec XIX wieku (Winnicki, Zemanek 2014). Rozwiązanie zagadki ich pochodzenia pozostawało poza możliwościami klasycznych badań metodami epibiontycznymi, stosowanymi powszechnie w biogeografii historycznej (Kornaś, Medwecka-Kornaś 2002). Dopiero zastosowanie metody PCR amplifikacji DNA stworzyło możliwość badania zmienności genetycznej organizmów w ich zasięgu geograficznym, czyli filogeografii (Avice 2008). Badania wchodzące w zakres niniejszej pracy mieszczą się właśnie w tej nowej dziedzinie badań biogeograficznych. Ich aspektem poznawczym są kwestie dotyczące przypuszczalnego istnienia glacialnych refugiów roślinności leśnej strefy umiarkowanej w Karpatach i obszarach przyległych. Klasyczny pogląd na ten temat zawiera się w twierdzeniu (por. Kornaś, Medwecka-Kornaś 2002), że czwartorzędowe zlodowacenia, w tym najzimniejszy okres ostatniego glacjału (pleniglacjał lub LGM – last glacial maximum, ok. 22–20 tys. lat temu), spowodowały wielką migrację flory leśnej typu arktyczno-trzeciorzędowego i jej „wycofanie” w Europie do trzech refugiów zlokalizowanych na półwyspach: Iberyjskim, Apenińskim i Bałkańskim. Model ten

znajduje silne poparcie w badaniach paleobotanicznych, gdzie na południu Europy notuje się nieprzerwany zapis w profilach palinologicznych drzew liściastych strefy umiarkowanej w okresie ostatnich 130 tysięcy lat (Tzedakis i in. 2002). W ostatnim dziesięcioleciu pojawiają się coraz częściej opracowania dopuszczające alternatywny scenariusz (ich krótki przegląd znajduje się w pracy Mitki i in. 2014). Według nowego ujęcia, w Europie środkowej i zachodniej mogły istnieć nierozpoznane dotychczas lokalne mikrorefugia (kryptorefugia) roślinności leśnej strefy umiarkowanej (Stewart, Lister 2001). Również Willis i in. (2000), na podstawie badań składu gatunkowego makroszczałków węgla drzewnych, pochodzących z gleb kopalnych i stanowisk archeologicznych, doszli do wniosku, że na Nizinie Węgierskiej podczas ostatniego pleniglacjału istniały enklawy termofilnej roślinności leśnej rozrzuconej pośród borów w typie lasu borealnego, a być może nawet w typie zbiorowiska tajgi lub lasów górskich z udziałem jodły *Abies alba* (Willis, Van Andel 2004). Oprócz tego odnaleziono również w północnej części tego obszaru fosylne węgle grabu *Carpinus betulus*, wskazujące na przetrwanie *in situ* drzew liściastych strefy umiarkowanej. Od tego czasu pojawia się coraz więcej publikacji poświęconych zagadnieniu „północnych refugium”, obejmujących obszar Europy środkowej i wschodniej. Również Jankovská i Pokorný (2008), na podstawie badań palinologicznych osadów torfowiskowych na stanowiskach w Czechach i na Słowacji, uzupełnionych badaniami składu makrofauny (Juříčková i in. 2014), sugerują znaczenie stosunkowo wilgotnych i chronionych od bezpośrednich wpływów ostrego klimatu dolin Karpat Zachodnich na stokach południowych zboczy Karpat jako potencjalnych ostoi roślinności leśnej. Porównanie współczesnych zbiorowisk roślinnych rosnących w warunkach klimatu zbliżonego do LGM w południowo-syberyjskich górach Ałtaj i Sajan wykazuje inną zależność (Magyari i in. 2014a). Lasy według tego ujęcia w klimacie lodowcowym mogły rozwijać się wzdłuż cieków wodnych, w wilgotnych obniżeniach terenu na stokach północnych, rzadziej południowych oraz na stromych zboczach poza dolinami rzecznyymi.

Magri i in. (2006) postulują istnienie refugium glacialnego buka *Fagus sylvatica* na Wyżynie Czesko-Morawskiej, natomiast Sutkowska i in. (2014) wskazują na lokalne mikrorefugia trawy leśnej *Bromus benekenii* w tym samym regionie Europy środkowej oraz w Europie zachodniej, m.in. w Masywie Centralnym. Według ostatnio przeprowadzonych rekonstrukcji zmian szaty roślinnej rumuńskich Karpat Wschodnich (Ciomadul Mts) końcowa faza ostatniego zlodowacenia (19 150 cal yr BP) charakteryzowała się znacznym zróżnicowaniem jej składu gatunkowego. Obok otwartych ziołoroślowych zbiorowisk tundry i stepu istniały w tym czasie w niższych położeniach górskich oraz na Nizinie Węgierskiej stanowiska gatunków leśnych strefy umiarowej jak leszczyna *Corylus*, buk *Fagus*, wiąz *Ulmus*, grab *Carpinus betulus* i jesion *Fraxinus excelsior* (Magyari i in. 2014b). Przykładowo, na górze Tokaj (północny kraniec Niziny Węgierskiej)

obecność grabu w postaci węgla drzewnych datowana jest na ok. 26500–27500 lat temu (Magyari 2002).

W tym względzie dodatkowej informacji dostarczają badania filogeograficzne nad zmiennością genetyczną leśnych gatunków roślin zielnych. Dla szeregu z nich postulowane jest istnienie ostoji glacialnych w środkowej Europie, omówione w pracy Mitki i in. (2014).

Przedmiotem niniejszego studium są badania populacyjno-genetyczne, których celem było określenie związków genetycznych na podstawie wskaźników zróżnicowania genetycznego u dwóch zielnych gatunków grądowych: przytulii Schultesa *Galium schultesii* Vest. i gwiazdnicy wielkokwiatowej *Stellaria holostea* L. Obydwa są składnikami piętra subalpejskiego pasma Bieszczadów (Karpaty Wschodnie). Ze względu na ekstrazonalne występowanie w obszarze górskim gatunków charakterystycznych dla niżowego zbiorowiska leśnego, mogą być podstawą interesujących hipotez filogeograficznych, dotyczących źródeł ich pochodzenia. Aby rekonstrukcja biogeograficzna stała się możliwa, należy *a priori* założyć istnienie pewnych genetycznych mechanizmów populacyjnych. Chociaż są to założenia teoretyczne, to jednak potwierdzone wynikami badań genetycznych nad długookresowymi (*long-term*) refugiami glacialnymi Europy południowej oraz zróżnicowaniem genetycznym populacji gatunków leśnych w umiarkowanych szerokościach geograficznych Europy zachodniej i środkowej (Petit i in. 2003). Po pierwsze, wyróżnicowanie lub dywergencja genetyczna (*disparity, divergence*) populacji refugialnych jest duże ze względu na istnienie w każdej z nich unikatowych alleli powstałych w wyniku długoterminowej akumulacji losowych zmian genomu – w rezultacie powstają obszary o dużej akumulacji zmienności genetycznej (*hot spots*). Po drugie, populacje kolonizujące w Holocenie obszary pojawiające się za cofającym się na północ lodowcem, pochodzące w wyniku migracji diaspor lub osobników, są genetycznie zubożone w wyniku efektu założyciela. Po trzecie, nowe populacje powstałe w wyniku krzyżowania się wielu dróg migracji mogą być genetycznie zróżnicowane, zwłaszcza gdy pochodzą z różnych refugiów (Petit i in. 2003). Założenie drugie i trzecie pozostają w pozornej sprzeczności. Powstanie nowej populacji związane jest z jej niewielkim genetycznym zróżnicowaniem, czyli tzw. efektem założyciela (*founder effect*). Można go zaobserwować na przykład na wyspach wulkanicznych (Sutkowska i in. 2015). Europa środkowa po ustąpieniu lodowca była świadkiem licznych wędrówek organizmów roślinnych i zwierzęcych związanych z odbudową ich zasięgów. Pochodziły one z różnych refugiów, a ich drogi migracji krzyżowały się tworząc strefy mieszańcowe (*suture-zones*, Taberlet i in. 1998). W takich strefach populacje są genetycznie bogate, gdyż ich allele pochodzą z różnych refugiów tworząc zjawisko tzw. genetycznego tygla (*genetic melting pot*).

Występowanie bieszczadzkiej populacji leśnych gatunków o charakterze grądowym w piętrze subalpejskim może mieć charakter reliktowy bądź też być

wynikiem stosunkowo niedawnej migracji w okresie Holocenu. „Reliktowy charakter” oznacza ich przetrwanie przynajmniej ostatniego LGM *in situ*. Taki charakter posiadają na przykład światłolubne gatunki wysokogórskie występujące w Bieszczadach Zachodnich, do których zalicza się m.in. *Aconitum bucovinense*, *Anemone narcissiflora*, *Carex rupestris*, *Delphinium elatum* subsp. *nacladense*, *Dianthus carthusianorum* subsp. *saxigenus*, *Polygonum viviparum* i *Sesleria bielzii* (Winnicki, Zemanek 2003). Analizy filogeograficzne, przeprowadzone w ostatnich latach nad gatunkami wysokogórskimi w Karpatach, prowadzą do wniosku, że okres ostatniego zlodowacenia przetrwały *in situ*, a ich lokalne zasięgi geograficzne nie podlegały większym zmianom (Ronikier 2011).

Do tych założeń należy dodać jeszcze jedno, dotyczące refugium „północnych”, na przykład karpackich. Należy spodziewać się ich dywergencji genetycznej, jednak, w przeciwieństwie do refugium południowoeuropejskich, nie przewiduje się tu wysokich wskaźników bogactwa genetycznego. Wynika to z faktu, iż podczas ostatniego zlodowacenia przypuszczalne kryptorefugia przeszły epizod ekologicznego wąskiego gardła, co spowodowało wtórne obniżenie ich różnorodności genetycznej. Cechami charakterystycznymi reliktowych populacji roślin leśnych powinny być zatem wysoki stopień dywergencji genetycznej w połączeniu z niewielkim bogactwem alleli (prążków AFLP). Badania genetyczne nad *Aconitum bucovinense* Zapał. na kresie zasięgu geograficznego w Bieszczadach Zachodnich wykazały, iż izolowane populacje bieszczadzkie posiadają charakter reliktowy (Boroń i in. 2011). Charakteryzowały się genetyczną tożsamością określoną na podstawie analizy molekularnej wariacji AMOVA ($p = 0,024$), wykazywały specyficzne fragmenty ISSR i obniżoną wartość wskaźnika różnorodności I Shannona. Wynik ten mógł być spowodowany obniżeniem liczebności i związanym z tym zjawiskiem genetycznego wąskiego gardła (*genetic bottleneck*).

Celem pracy jest określenie wzorca zmienności genetycznej populacji przytulii Schultesa *Galium schultesii* i gwiazdnicy wielkowiekowej *Stellaria holostea* występujących na połoninach Bieszczadów Zachodnich, w porównaniu do populacji znajdujących się w innych rejonach Karpat Wschodnich i obszarów przyległych. Szczegółowe zagadnienia odnoszą się do następujących kwestii: (I) czy populacje bieszczadzkie posiadają odrębność genetyczną w porównaniu do reszty badanego obszaru? (II) czy są jednorodnie genetycznie, czy też ich zróżnicowanie międzypopulacyjne jest duże? (III) czy zaznacza się ich powinowactwo genetyczne z jakimś szczególnym obszarem? (IV) czy są genetycznie zubożone w porównaniu do innych regionów? Uzyskanie odpowiedzi na tak postawione pytania pozwoli na wyciągnięcie wniosków odnośnie historii zasięgów tych leśnych gatunków w piętrze subalpejskim Bieszczadów Zachodnich.

Materiały i metoda

Badania przeprowadzono w Karpatach i obszarach przyległych: Nizinie Węgierskiej, Podolu i Siedmiogrodzie oraz na północ od łuku Karpat. Dla *Galium schultesii* ustalono kombinacje starterów AFLP: EcoRI-ACA/MseI-CAT, EcoRI-ACA/MseI-CTA, EcoRI-AGC/MseI-CAG. I kombinacja – 52 loci, II kombinacja – 63 loci, III kombinacja – 85 loci. W badaniach wykorzystano 121 okazów, dla których powtarzalną amplifikację uzyskano na poziomie 97,2% według procedury kontrolnej zaproponowanej przez Bonin i in. (2007). Dla *Stellaria holostea* ustalono trzy pary kombinacji starterów AFLP: I kombinacja – EcoRI-AAC, MseI-CAA, II kombinacja – EcoRI-AAC, MseI-CAC i III kombinacja EcoRI-AAC, MseI-CAG). Liczba loci w dwóch pierwszych wynosi 137, w kombinacji III – 82 loci. W badaniach wykorzystano 141 okazów, dla których powtarzalną amplifikację uzyskano na poziomie 98,8%. Pobrane do badań osobniki znajdowały się w odległości przynajmniej 5 m, co powoduje, że większość populacji wysokogórskich reprezentowana jest przez niewielką liczbę osobników. Zarówno *Stellaria holostea* jak i *G. schultesii* są wskaźnikami „starych lasów” (*ancient forests*, por. Dzwonko, Loster 2001). W związku z tym posiadają szereg specyficznych cech biologicznych: niewielkie możliwości kolonizacji nowych obszarów, niską przeżywalność i słabe rozmnażanie generatywne w warunkach suboptymalnych i klonalny typ wzrostu, sprzyjający formowaniu reliktowych populacji.

Produkty amplifikacji zapisano w postaci macierzy 0–1. Zmienność wewnątrzpopulacyjną określono udziałem procentowym prążków (loci) polimorficznych (PLP), oczekiwaną heterozygotycznością lub wskaźnikiem różnorodności genowej (h) wg Neia (1973), uzyskanymi za pomocą oprogramowania AFLP-SURV (Vekemans 2002) i wskaźnikiem różnorodności Shannona (Shannon, Weaver 1949) (I), obliczonym z pomocą POPGENE ver. 1.31 (Yeh i in. 1999). Frekwencja alleli, na której opiera się wskaźnik różnorodności genowej h Neia, została obliczona na podstawie metody bayesowskiej z wykorzystaniem nie zunifikowanego rozkładu prawdopodobieństwa „prior”, który zmniejsza obciążenie metody „pierwiastków” (Zhivotovsky 1999). Rozkład frekwencji alleli był oszacowany oddzielnie dla każdej populacji. Statystyki genetycznego zróżnicowania i populacyjnej struktury genetycznej były obliczane według ujęcia Lyncha i Milligana (1994). Wskaźniki zróżnicowania genetycznego na poziomie populacyjnym, obliczane na podstawie rozkładu prążków AFLP u poszczególnych osobników są wiarygodne, gdy spełnione są trzy warunki: (I) produkty AFLP segregują w sposób mendlowski jako allele dominujące; (II) frekwencje genotypów w loci AFLP znajdują się w równowadze Hardy-Weinberga; (III) wspólnie migrujące fragmenty są rozpatrywane jako loci homologiczne (Apostol i in. 1996).

Dodatkowo obliczono wskaźniki bogactwa genetycznego: *FA* – dotyczący średniej liczby prążków przypadających na populację, *F_{max}* – maksymalnej liczby prążków u osobnika w populacji. Obliczono indeks dywergencji genetycznej populacji *DW* (Schönswetter, Tribsch 2005) z wykorzystaniem skryptu programu R zawartego w pakiecie AFLPdat (Ehrich 2006). Wskaźnik ten obliczano jako liczbę wystąpień markera w populacji podzieloną przez całkowitą liczbę jego wystąpień w całym zestawie danych. W rezultacie wszystkie te wartości są sumowane i standaryzowane biorąc pod uwagę liczbę markerów i osobników (Ehrich 2006). Wskaźniki *FA* i *DW* obliczono jako średnie dla populacji i jako wartości charakteryzujące poszczególne okazy (osobniki). Wysokie wartości wskaźnika *DW* są oczekiwane w długo izolowanych populacjach (Paun i in. 2008). Istotność statystyczną różnic pomiędzy wartościami populacyjnymi wskaźnika w poszczególnych regionach populacji testowano za pomocą testu *F* prostej analizy wariancji i nieparametrycznych testów Kruskala-Wallisa lub Manna-Whitneya (dla porównania dwóch średnich), natomiast kontrasty *a posteriori* przy pomocy testu najmniejszej istotnej różnicy NIR dla danych nierównolicznych. Założenie dotyczące równości wariancji (homoscedastyczności) przy teście *F* sprawdzono przy użyciu testu Levene’a. Obliczeń dokonano w programie STATISTICA 10 (www.statsoft.com).

Ponieważ liczebność *n* próby w poszczególnych populacjach *Galium schultesii* różniła się w zakresie 2–8, a u *Stellaria holostea* w zakresie 2–10, ustalono wpływ liczebności próby *n* na wielkość wskaźników genetycznych za pomocą współczynnika korelacji Pearsona *r*. U *G. schultesii* statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) okazały się związki liczebności próby z: procentem polimorficznych loci *PPL* ($r = 0,65$), wskaźnikiem Shannona *I* ($r = 0,46$) i maksymalną liczbą prążków na osobnika w populacji *F_{max}* ($r = 0,45$). Pozostałe wskaźniki: zróżnicowania genowego *h*, genetycznej dywergencji *DW* oraz średniej liczby prążków w populacji *FA* okazały się nieskorelowane ($p > 0,05$) z liczebnością próby. U *S. holostea* statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) okazały się związki liczebności próby z: procentem loci polimorficznych *PPL* ($r = 0,89$) i wskaźnikiem różnorodności Shannona *I* ($r = 0,85$). Pozostałe wskaźniki: zróżnicowania genowego *h*, genetycznej dywergencji *DW*, średniej liczby prążków w populacji *FA* i maksymalnej liczby prążków na osobnika w populacji *F_{max}* są nieskorelowane ($p > 0,05$) z liczebnością próby.

Odległość genetyczną pomiędzy populacjami określono na podstawie odległości genetycznej *Neia D*, według metodyki zaproponowanej przez Lynch’a i Milligana (1994). Odległość genetyczną pomiędzy każdą parą populacji obliczono na podstawie metody bootstrapowania loci metodą Monte Carlo na podstawie 1000 losowych permutacji z zastosowaniem programu AFLP-SURV.

Macierze te następnie importowano do programu PHYLIP (Felsenstein 2005), gdzie uzyskano topologie NJ. Uzgodnione (*consensus*) drzewo NJ (Sa-

itou, Nei 1987) otrzymano w programie MEGA5 (Tamura i in. 2011). Retikulacje pomiędzy gałęziami drzewa NJ (Legendre, Makarenkov 2002) obliczono przy pomocy programu T-Rex (Makarenkov 2001).

Wzajemne relacje podobieństwa genetycznego poszczególnych okazów określono na podstawie metody porządkującej DCA (nietendencyjnej analizy zgodności). Występowanie poszczególnych prążków AFLP wzdłuż trzech pierwszych osi testowano używając uogólnionego modelu liniowego (*General Linear Model* GLM) z wykorzystaniem funkcji wiążącej *logit* i rozkładu dwumianowego (Agresti 2007). Obliczenia wykonano przy użyciu programu CANOCO 5 (ter Braak, Šmilauer 2012).

Liczbę odrębnych grup genetycznych określono również za pomocą programu STRUCTURE ver. 2.3.3 (Pritchard i in. 2000), stosując Bayesowski algorytm klasyfikacji markerów dominujących (Falush i in. 2007). Liczba $K = 1-10$ grup była testowana w 10 replikacjach dla każdego K . Opcja „*burn-in period*” wynosiła 200000, a liczbę łańcuchów Markowa Monte Carlo (MCMC) ustalono na 500000. Zastosowano model „*admixture*” i opcję nieskorelowanych alleli. Wskazanie optymalnej liczby grup wynikało z wartości oszacowanych prawdopodobieństw *a posteriori* obliczanych przez program, opisanych w relacji do wzrastającego K (Pritchard i in. 2000) i wartości *DeltaK*, szacującej zmianę wartości funkcji wiarygodności odnośnie do K (Evanno i in. 2005). Statystyki te obliczono programem przy pomocy STRUCTURE HARVESTER (Earl, van Holdt 2012).

Podział zmienności genetycznej populacji ustalony został na podstawie analizy molekularnej wariacji (AMOVA) i poziomu istotności na podstawie 1023 permutacji. Obliczeń dokonano przy pomocy pakietu programów Arlequin ver. 3.5 (Excoffier, Lischer 2010).

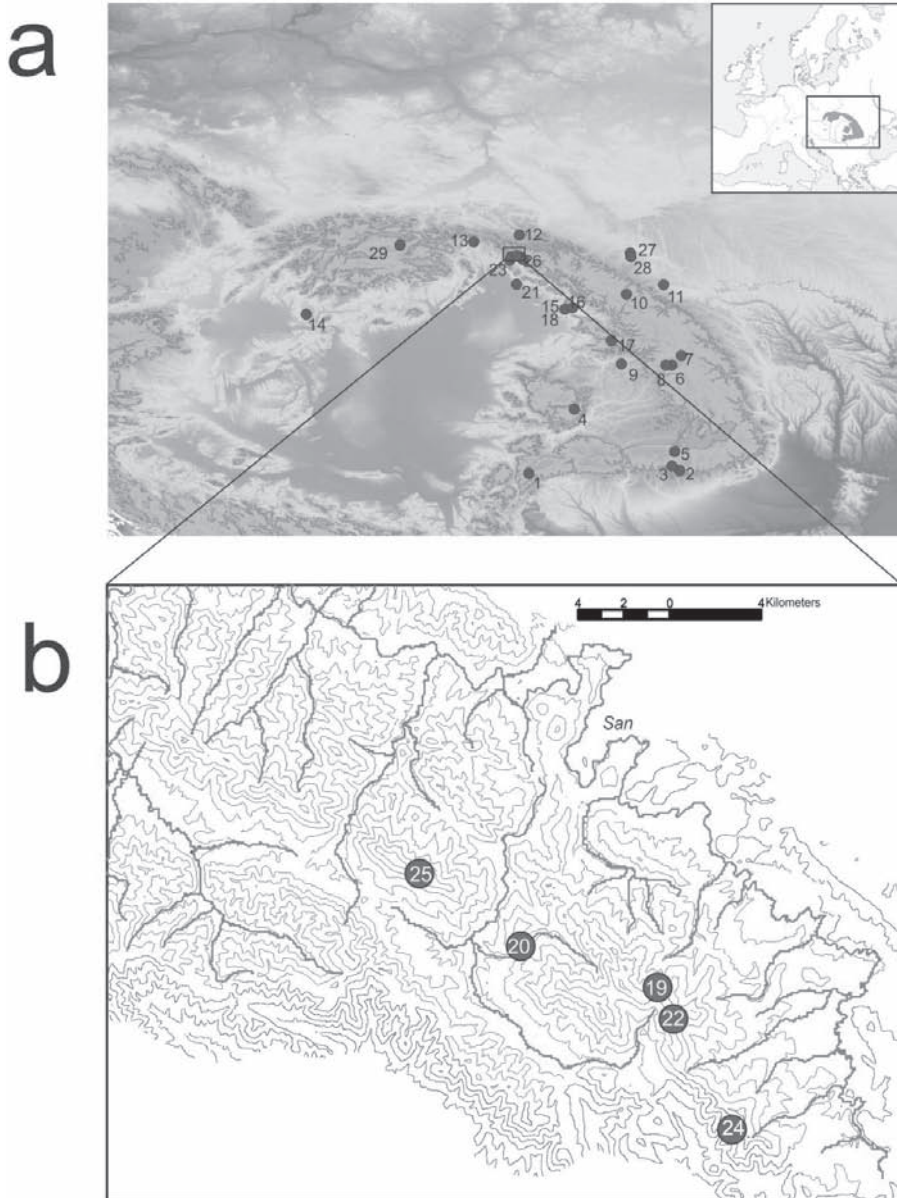
Wyniki

Galium schultesii

Próby do badań pochodziły z 29 populacji rozmieszczonych w Karpatach, Nizinie Węgierskiej (Panonii), Podolu i Siedmiogrodzie (Ryc. 1). Łącznie do analiz wybrano 200 prążków AFLP, a błąd powtórzeń wynosił 2,8%. Charakterystykę badanych populacji *G. schultesii* przedstawiono w Tabeli 1.

Populacja bieszczadzka *G. schultesii* nie różni się statystycznie ($p = 0,84$) od reszty badanego obszaru pod względem podziału wariacji molekularnej AMOVA na składową międzygrupową i wewnątrzgrupową (Tabela 2).

Najwyższe wartości wskaźnika zróżnicowania genowego h stwierdzono w populacji CC (0,1667 – Karpaty Południowe) i BK (0,1651 – Bieszczady Zachodnie). Wysokie wartości tego wskaźnika stwierdzono również u dwóch innych populacji bieszczadzkich: RS i BRS, tj. 0,1602 i 0,1606, odpowiednio. Najwyższą wartość wskaźnika dywergencji genetycznej DW stwierdzono w po-



Ryc. 1. a – Rozmieszczenie badanych populacji *Galium schultesii* w Karpatach i obszarach przyległych. **b** – Rozmieszczenie w polskich Bieszczadach Zachodnich. Numery populacji odpowiadają ich kolejności w Tabeli 1.

Fig. 1. a – Distribution of populations under study of *G. schultesii* in the Carpathians and adjoin regions. **b** – distribution in Polish Western Bieszczady Mts. The numbering of populations follow those in Table 1.

Tabela 1. Charakterystyka populacji *Galium schultesii* w Karpatach i obszarach przyległych. n – liczebność próby, W_{ys} – położenie m.n.p.m., N – długość geograficzna, E – szerokość geograficzna, PPL – procent prążków polimorficznych, h – wskaźnik różnorodności genowej Neia, DW – wskaźnik genetycznej dywergencji populacji, I – wskaźnik różnorodności Shannona, FA – średnia liczba prążków AFLP u osobnika w populacji, F_{Amax} – maksymalna liczba prążków AFLP u osobnika w populacji.

Table 1. Characteristics of populations of *Galium schultesii* in the Carpathians and adjoining regions. n – sample size, $Alt.$ – altitude m.a.s.l., N – longitude, E – latitude, PPL – percent of polymorphic bands, h – Nei's gene diversity, DW – genetic divergence index, I – Shannon's index of diversity, FA – mean number of AFLP bands in the population, F_{Amax} – maximum number of AFLP bands in the population.

Nr No.	Kod Code	Stanowisko Locality	Region* Region*	n	N	E	W_{ys} $Alt.$	PPL	h	DW	I	FA	F_{Amax}
1	CC	Cheile Butii	SC	3	45 18	22 58	905	33,2	0,1667	2,248	0,147	36,0	38
2	BU	Bușteni	SC	8	45 23	25 30	1450	44,6	0,1363	1,372	0,158	35,3	41
3	PC	Piatra Craiului	SC	4	45 31	25 16	1082	37,6	0,1589	2,081	0,156	35,5	38
4	CT	Turda	TR	6	46 33	23 40	550	38,6	0,1401	1,743	0,144	37,2	40
5	BD	Bogata Olteană	TR	4	45 57	25 21	580	36,6	0,1551	1,471	0,144	36,8	37
6	GH	Gura Haitii	EC	4	47 12	25 16	1050	34,2	0,1506	1,805	0,143	35,3	39
7	CM	Câmpulung Moldovenesc	EC	4	47 29	25 33	775	32,7	0,1458	1,265	0,128	37,5	42
8	DO	Domșoara	EC	4	47 12	25 05	1065	29,7	0,1294	1,160	0,113	33,8	37
9	CE	Cepari	EC	2	47 14	24 25	340	23,3	0,1424	0,912	0,090	32,0	32
10	NAL	Nadvirna	ECF	4	48 39	24 34	525	32,2	0,1370	1,393	0,118	36,3	41
11	MO	Antonivka	ECF	5	48 56	25 01	230	26,2	0,1319	1,156	0,123	36,0	40
12	KT	Pralkowce	ECF	5	49 45	22 41	295	35,1	0,1375	1,356	0,127	37,0	44
13	ZO	Zarszyn	ECF	4	49 33	21 59	230	29,2	0,1335	1,276	0,121	33,5	40
14	SAH	Šahy	PA	4	48 03	18 57	465	32,2	0,1374	1,542	0,121	34,3	38
15	MU	Mala Uholka	ZA	3	48 15	23 37	550	26,2	0,1376	0,957	0,105	35,7	39

16	NAN	Nankovo	ZA	4	48 12	23 23	220	34,7	0,1482	1,464	0,128	39,0	42
17	KU	Kuzij	ZA	5	47 56	24 07	515	33,7	0,1369	1,132	0,134	34,6	42
18	UM	Mala Uholka	ZA	4	48 15	23 37	710	40,1	0,1581	6,674	0,199	31,3	36
19	KRZ	Krzemień	B	6	49 04	22 44	1260	34,2	0,1416	0,996	0,140	32,5	37
20	BT	Terebowiec	B	2	49 05	22 43	990	23,8	0,1262	1,564	0,066	37,0	38
21	RU	Rusky Potok	B	4	49 00	22 24	375	38,1	0,1602	1,397	0,150	37,3	41
22	BK	Kopa Bukowska	B	5	49 04	22 45	1255	46,5	0,1651	2,783	0,186	36,2	44
23	RS	Rabia Skala	B	4	49 06	22 26	1160	33,2	0,1602	1,969	0,134	38,0	42
24	BRS	Rozsypaniec Stinski	B	2	49 01	22 49	1180	26,2	0,1606	2,416	0,102	36,0	36
25	PCL	Polonina Caryńska	B	5	49 08	22 36	1230	35,6	0,1407	1,656	0,141	35,0	41
26	PU	Zhornava	B	4	48 57	22 36	480	35,1	0,1525	1,670	0,172	32,3	34
27	KH	Kasova Hora	PO	4	49 13	24 41	250	30,7	0,1416	1,035	0,129	34,8	38
28	HAP	Halicz	PO	4	49 06	24 42	290	28,2	0,1243	1,056	0,105	33,3	35
29	KR	Krościenko n/ Dunajcem	WC	4	49 27	20 26	610	22,8	0,0812	0,934	0,057	35,0	36

* - SC – Karpaty Południowe/Southern Carpathians, TR – Siedmiogród/Transilvania, EC – Karpaty Wschodnie/Eastern Carpathians, ECF – Pogórza Karpat Wschodnich/Foothills of Eastern Carpathians, PA – Nizina Węgierska/Pannonian Basin, ZA – Zakarpacie/Transcarpathia, B – Bieszczady/Bieszczady Mis, PO – Podole/Podolia, WC – Karpaty Zachodnie/Western Carpathians

Tabela 2. Analiza molekularnej wariancji (AMOVA) badanych populacji *Galium schultesii* i *Stellaria holostea*. d.f. – liczba swobody. Analiza dotyczy (1) ogólnej zmienności populacji; (2) populacji bieszczadzkich na tle pozostałych badanych populacji; (3) populacji uznanych za przypuszczalnie refugialne na podstawie analizy GLM i STRUCTURE. *Galium schultesii* Bieszczady: Kopa Bukowska (BK), Zhornava (PU); Zakarpacie: Uholka (UM); Południowe Karpaty: Piatra Craiului (PC). *Stellaria holostea* Bieszczady: Rozsypaniec (BRO), Połonina Wetlińska (PW), Krzemień (KRZ), Nova Sedlica (NS), Sine Wiry (SW); Karpaty Wschodnie: Galgau (DE), Šapanta (SA); Kotlina Sandomierska: Lipówka – Puszcza Niepolomicka (PN).

Table 2. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of the investigated populations *Galium schultesii* and *Stellaria holostea*. d.f. – degrees of freedom. Analysis concerns: (1) total variability of the populations; (2) the Bieszczady's populations against the remaining populations; the presumed refugial based on GLM and STRUCTURE analyses. In *G. schultesii* Bieszczady: Kopa Bukowska (BK), Zhornava (PU); Transcarpathia: Uholka (UM); Southern Carpathians: Piatra Craiului (PC). *Stellaria holostea* Bieszczady: Rozsypaniec (BRO), Połonina Wetlińska (PW), Krzemień (KRZ), Nova Sedlica (NS), Sine Wiry (SW); Eastern Carpathians: Galgau (DE), Šapanta (SA); Kotlina Sandomierska Basin: Lipówka – Puszcza Niepolomicka (PN).

Źródło zmienności/ <i>Source of variation</i>	<i>Galium schultesii</i>				<i>Stellaria holostea</i>					
	d.f.	Suma kwadratów <i>Sum of squares</i>	Składowa wariancji <i>Variance components</i>	Procent wariancji <i>Percentage of variation</i>	p	d.f.	Suma kwadratów <i>Sum of squares</i>	Składowa wariancji <i>Variance components</i>	Procent wariancji <i>Percentage of variation</i>	p
1. Ogólne/Total										
Pomiędzy populacjami <i>Among populations</i>	1	34,05	0,30	1,86		1	122,97	1,54	6,37	-
Wewnątrzpopulacyjne <i>Within populations</i>	120	1910,25	16,05	98,14		139	3148,04	22,65	93,63	-
2. Bieszczady										
Pomiędzy grupami <i>Between groups</i>	1	17,64	-0,11	-0,66	0,845	1	48,63	0,11	0,45	0,180

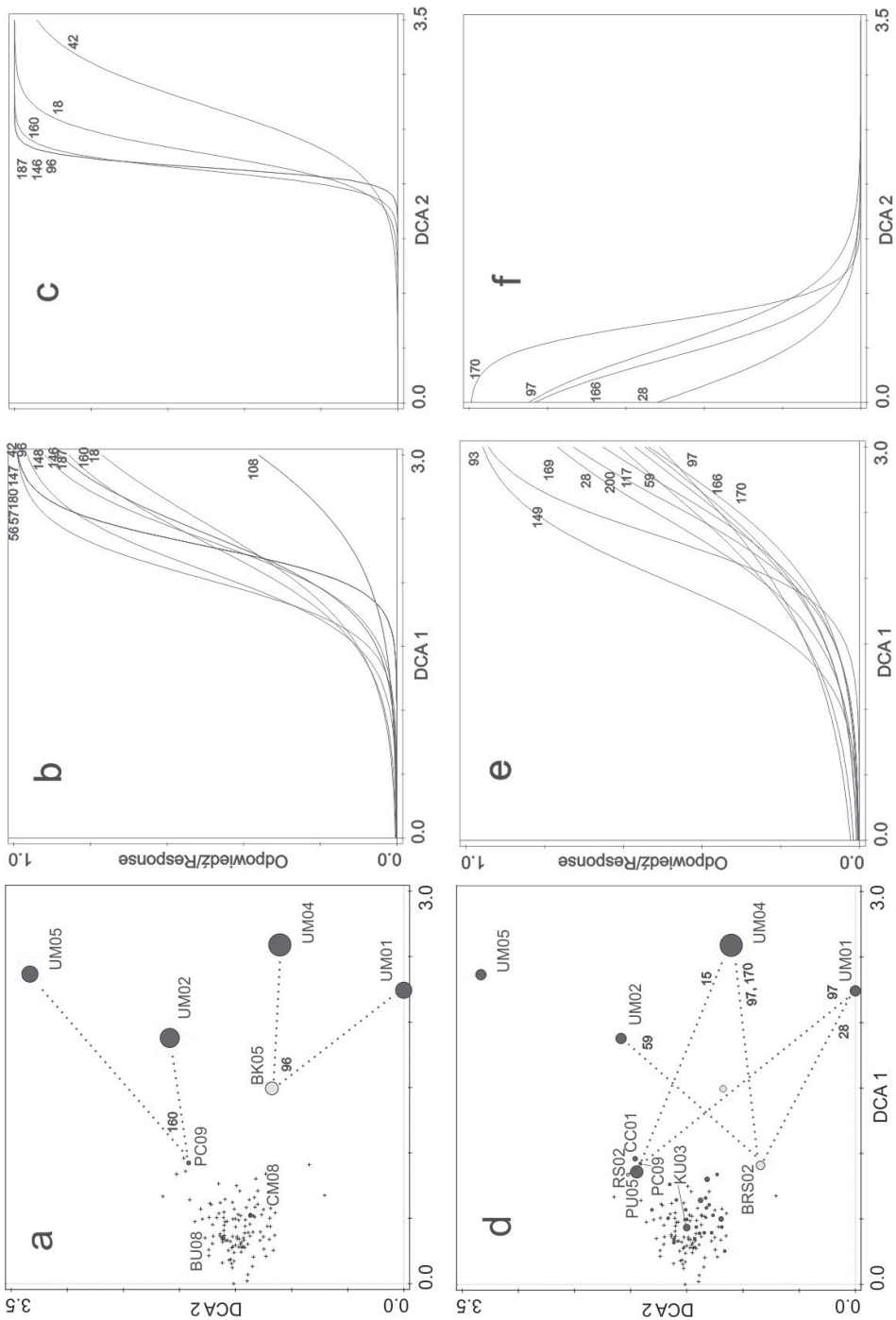
Pomiędzy populacjami wewnątrz grup/ <i>Between</i> <i>populations within groups</i>	27	596,76	1,84	11,38		33	1205,34	4,40	18,70	-
Wewnątrzpopulacyjne <i>Within populations</i>	92	1329,90	14,46	89,28		106	2017,04	19,03	80,85	-
3. Populacje refugialne / <i>Refugial populations</i>										
Pomiędzy grupami <i>Between groups</i>	1	44,86	0,80	4,77	0,006	1	180,95	2,83	11,22	< 0,001
Pomiędzy populacjami wewnątrz grup/ <i>Between</i> <i>populations within groups</i>	27	569,54	1,60	9,48		33	1073,02	3,40	13,47	-
Wewnątrzpopulacyjne <i>Within populations</i>	92	1329,90	14,46	85,75		106	2017,04	19,03	75,31	-

pulacji zakarpackiej UM (6,67), w populacjach bieszczadzkich BK (2,78) i BRS (2,41) oraz z Karpat Południowych CC (2,25) i Karpat Wschodnich PC (2,08). Największą średnią liczbę prążków AFLP w populacji (wskaźnik FA) zanotowano w populacji NAN (39,0) z Zakarpacia oraz RS (38,0) z Bieszczadów Zachodnich, najmniejszą w UM (31,3 – Zakarpacie) i CE (32,0 – Karpaty Wschodnie).

Analizy GLM 121 okazów i 200 prążków AFLP wykazały odrębność genetyczną osobników należących do 2 grup A i B. Rozmieszczenie poszczególnych prążków według zastosowanego modelu wzdłuż osi DCA przedstawiono na rycinie 2. Najbardziej wyróżniającą grupę (na podstawie prążków grupy A) tworzą cztery okazy pochodzące z Zakarpacia UM, które posiadają wspólne prążki z okazem z Bieszczadów Zachodnich: BK05 (prążek nr 96) i masywu Piatra Craiului w Karpatach Południowych PC09 (nr 160). Inne prążki grupy A stwierdzono również u okazów BU08 i CM08, pierwszy z Karpat Południowych, drugi z Karpat Wschodnich (Ryc. 2a-c). Odrębna okazała się również grupa B (Ryc. 2d-f). Tu zwraca uwagę okaz BRS02 (Bieszczady Zachodnie), który posiada wspólne prążki (28, 59, 97, 170) z okazami pochodzącymi z Zakarpacia: UM01, UM02 i UM04. Okaz z Zakarpacia UM04 posiada również wspólne prążki z PU05 Bieszczadów Wschodnich, a UM01, obok wymienionego już BRS02, również z Bieszczadów Zachodnich RS02 (prążek nr 97) oraz z Piatra Craiului PC09 (nr 15, związek statystycznie nieistotny, $p < 0,05$). Prążki z grupy B pojawiły się także m.in. u okazów CC01 (Karpaty Południowe) i KU03 (Zakarpacie).

Ryc. 2. Uogólnione modele liniowe (GLM) dla genetycznej grupy A i B prążków AFLP *Galium schultesii* wzdłuż dwóch pierwszych osi DCA. **a** – rozmieszczenie 121 okazów *Galium schultesii* na tle częstości występowania prążków grupy A; ich wspólne występowanie z populacjami bieszczadzskimi zaznaczono przerywanymi liniami; **b** – GLM dla osi 1 DCA, **c** – GLM dla osi 2 DCA, numery oznaczają prążki należące do grupy A; **d** – rozmieszczenie 121 okazów *Galium schultesii*, na tle częstości występowania prążków grupy B, ich wspólne występowanie z populacjami bieszczadzskimi zaznaczono przerywanymi liniami; **e** – GLM dla osi 1 DCA, **f** – GLM dla osi 2 DCA; numery oznaczają prążki AFLP z statystycznie istotną odpowiedzią ($p \leq 0,05$). Kolorem rozjaśnionym zaznaczono okazy z Bieszczadów Zachodnich.

Fig. 2. Generalized Linear Models (GLMs) for genetic Groups A and B of AFLP bands of *Galium schultesii* along the first two Axes of DCA. **a** – distribution of 121 specimens of *Galium schultesii* on the background of the frequency of occurrence of bands from Group A; their common occurrence with the Bieszczady's populations were marked with dotted lines; **b** – GLMs for DCA Axis 1; **c** – GLMs for DCA Axis 2; **d** – distribution of 121 specimens of *Galium schultesii* on the background of the frequency of occurrence of bands from Group B; their common occurrence with the Bieszczady's populations were marked with dotted lines; **e** – GLMs for DCA Axis 1; **f** – GLMs for DCA Axis 2; the numbers denote AFLP bands with statistically significant ($p \leq 0.05$) responses. Specimens from the Bieszczady Mts are marked in light colour.



Analiza struktury genetycznej z wykorzystaniem programu STRUCTURE wykazała istnienie dwóch grup genetycznych *Galium schultesii* A i B oraz grupy pośredniej A/B, wyróżnionej na podstawie prawdopodobieństwa *a posteriori* grupy A pomiędzy 0,2422 a 0,6166 (Ryc. 3a). Wynik ten jest zgodny z otrzymanym w analizie GLM. Okazy grupy B wyróżnionej w analizie STRUCTURE odpowiadają okazom opisanym jako grupa A w analizie GLM (Ryc. 3b). Są to: UM01, UM02, UM04 i UM05 (Zakarpacie), BK05 (Bieszczady Zachodnie) oraz okazem zaliczonym do grupy B: CC01 (Karpaty Południowe) i PU05 (Bieszczady Wschodnie). Do grupy pośredniej A/B zostały zaliczone: BK02-3, BRS02,

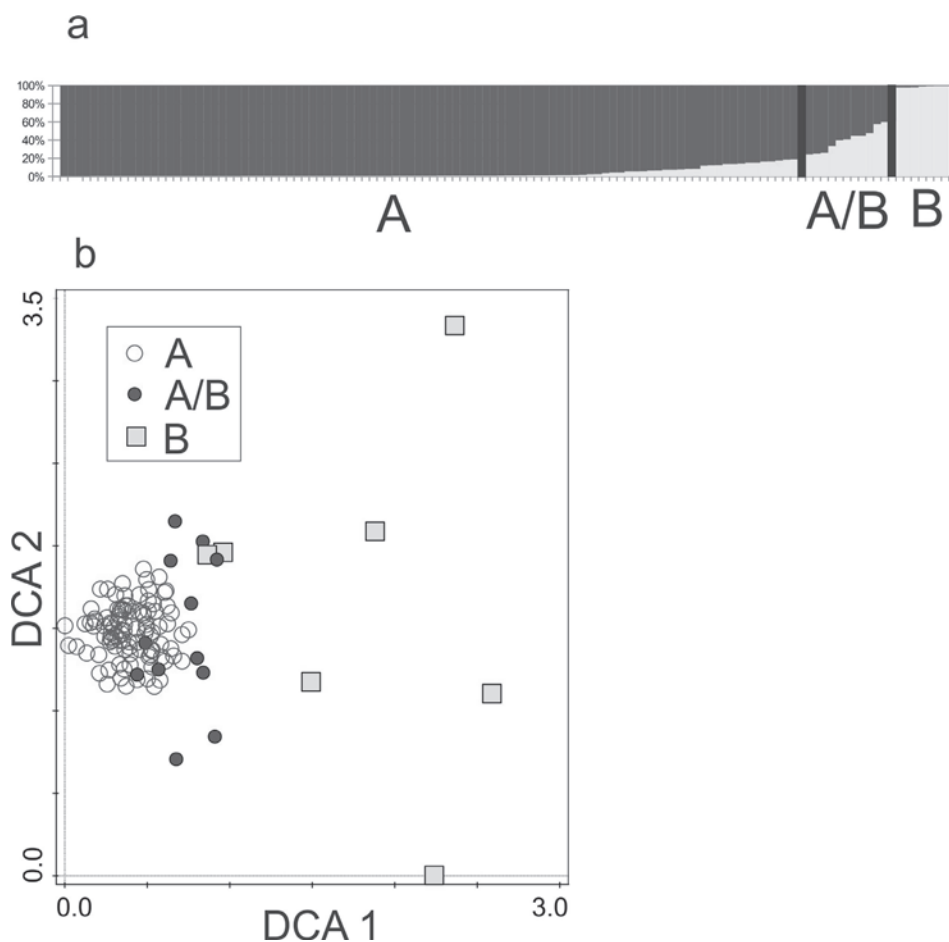


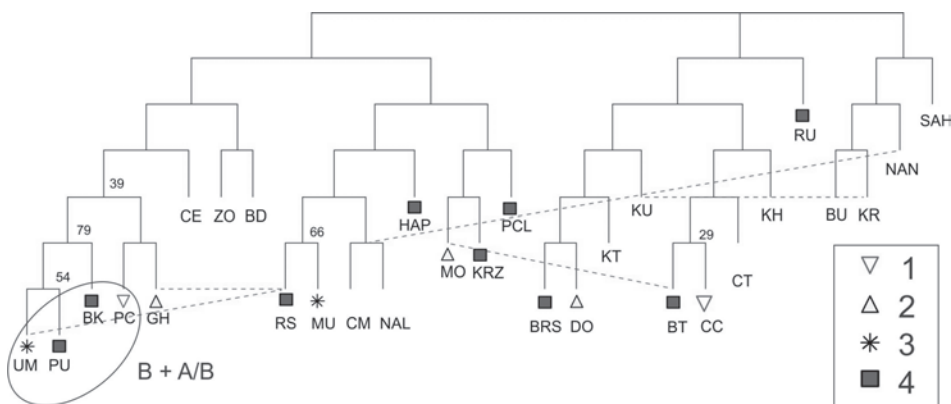
Fig. 3. Analiza STRUCTURE 121 okazów *Galium schultesii* z Karpatach i terenów przyległych w osiach DCA. a – STRUCTURE; rozmieszczenie grup genetycznych A, A/B i B wzdłuż osi DCA.

Fig. 3. STRUCTURE analysis of 121 specimens of *Galium schultesii* from the Carpathians and adjoining regions. a – STRUCTURE; b – distribution of genetic Groups A, A/B and B along the DCA Axes.

PCI01, RS02, RS04-5 (Bieszczady Zachodnie), GH07 (Karpaty Wschodnie), PC07 i PC09 (Karpaty Południowe), SAH02 (Nizina Węgierska).

Test U Manna-Whitneya wykazał statystyczną istotność ($Z = -4,62$, $p < 0,0001$) różnicę pomiędzy średnim wskaźnikiem DW dla grup A ($1,379 \pm 0,611$) i B ($4,691 \pm 2,391$) (okazy przejściowe A/B zostały zaklasyfikowane do jednej z grup na podstawie prawdopodobieństwa a posteriori mniejszego lub większego od 0,5).

Algorytm NJ grupuje, z największym poparciem 79%, UM (Zakarpacie) i BK i PU (Bieszczady) (Ryc. 4). Siostrzaną pozycję, z niewielkim poparciem 39%, zajmują populacje PC (Karpaty Południowe) i GH (Karpaty Wschodnie). W innej grupie o poparciu 66% RS (Bieszczady Zachodnie) tworzy klastery z MU (Zakarpacie) i wykazuje retikulację z UM (Zakarpacie) i GH (Karpaty Wschodnie). Pozostałe grupy posiadają niewielkie wsparcie poniżej 34%. Populacja KR wykazała retikulację z KU (Zakarpacie), natomiast NAN (Zakarpacie) z CM i NAL (Karpaty Wschodnie i ich przedgórze) oraz BT (Bieszczady Zachodnie) z MO (przedgórze Karpat Wschodnich). Na podstawie uzyskanego drzewa NJ można wyróżnić grupę populacji *G. schultesii* o przypuszczalnym refugialnym charakterze. Obejmuje ona genetyczną grupę A wyróżnioną według analizy GLM i ściśle pokrywającą się z nią grupę B według analizy STRUCTURE. Należą tu populacje z Bieszczadów Zachodnich BK (Kopa Bukowska) i PU (Zhornava – Przełęcz Użocka) oraz Piatra



Ryc. 4. NJ klasyfikacja z retikulacjami 29 populacji *Galium schultesii* z Karpat i terenów przyległych. Nazwy populacji jak w Tabeli 1. 1 – Karpaty Południowe, 2 – Karpaty Wschodnie, 3 – Zakarpacie i Podole, 4 – Bieszczady. Liczby w węzłach oznaczają wartości bootstrap określone na podstawie 1000 permutacji. Przynależność do grupy B i A/B według STRUCTURE.

Fig. 4. NJ classification with reticulations of 29 populations of *Galium schultesii* from the Carpathians and adjoin region. Names of populations like those in Table 1. 1 – Southern Carpathians, 2 – Eastern Carpathians, 3 – Transcarpathia and Podolia, 4 – Bieszczady Mts. Number in nodes denote bootstrap values based on 1000 permutations. Genetic membership of Groups B and A/B according to STRUCTURE.

Craiului (PC) i Mała Uholka (Zakarpacie). Tworzą one przypuszczalną grupę refugialną, która statystycznie istotnie ($p = 0,006$) odróżnia się od grupy nierefugialnej, a ich składowa międzygrupowa AMOVA wynosi 4,8% (Tabela 2).

Przypuszczalna grupa refugialna *G. schultesii* charakteryzuje się istotnie większym poziomem zróżnicowania genetycznego (Tabela 3): procentem loci polimorficznych *PLP* ($p = 0,008$), zróżnicowaniem genowym h (0,037), współczynnikiem różnorodności Shannona I ($p < 0,001$) oraz wskaźnikiem dywergencji genetycznej *DW* ($p = 0,007$), w porównaniu do grupy nierefugialnej. Brak różnic w przypadku wskaźników *FA* ($p = 0,09$) i *F_{Amax}* ($p = 0,52$).

Stellaria holostea

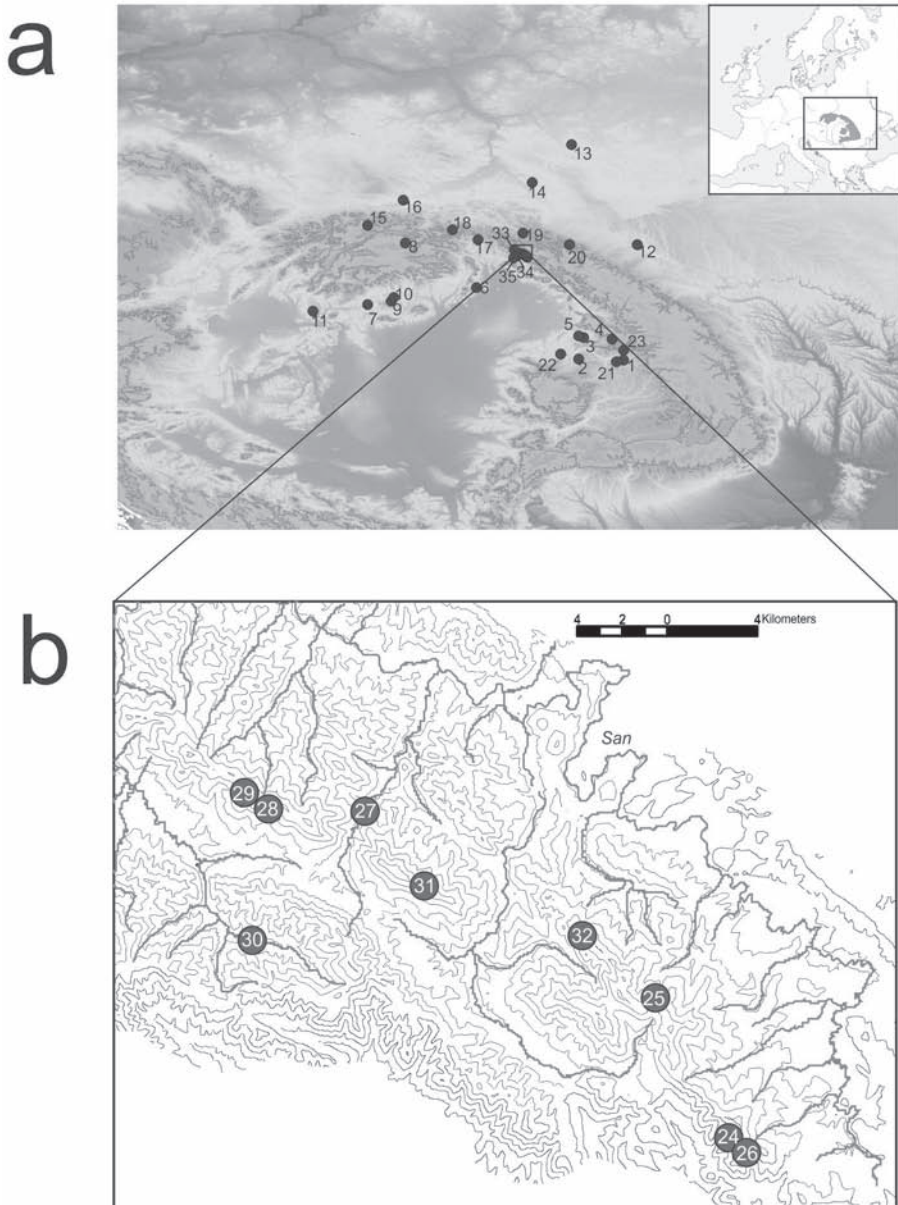
Próbkę badawczą tworzyło 35 populacji rozmieszczonych w Karpatach, Podolu, Nizinie Węgierskiej, Siedmiogrodzie, Kotlinie Sandomierskiej, Polesiu i Rostoczu (Ryc. 5). Łącznie do analiz użyto 219 prążków AFLP, a błąd powtórzeń wynosił 1,2%. Charakterystykę badanych populacji *S. holostea* przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 3. Prosta analiza wariancji (model II) wskaźników genetycznego zróżnicowania (średnia i błąd standardowy w nawiasach) przypuszczalnych populacji refugialnych i nierefugialnych *Galium schultesii* i *Stellaria holostea*. Status populacji został określony na podstawie analizy GLM i STRUCTURE (patrz także Tabela 2).

Table 3. One-way ANOVA (model II) for indices of genetic diversity (mean and standard error in brackets) of putative refugial and non-refugial populations of *Galium schultesii* and *Stellaria holostea*. Status of the populations based on GLM and STRUCTURE analyses (see also Table 2).

	<i>n</i>	<i>PPL</i>	<i>h</i>	<i>DW</i>	<i>I</i>	<i>FA</i>	<i>F_{Amax}</i>
<i>Galium schultesii</i>							
Nierefugialne/ <i>Non-refugial</i>	25	31,80 (1,05)	0,14 (0,003)	1,41 (0,08)	0,12 (0,006)	35,55 (0,44)	39,04 (0,55)
Refugialne/ <i>Refugial</i>	4	39,82 (2,45)	0,16 (0,002)	3,30 (0,47)	0,18 (0,009)	33,80 (0,60)	38,00 (2,16)
Błąd I rodzaju/ <i>I-type error</i>		0,008	0,037	0,007*	<0,001	0,09	0,52
<i>Stellaria holostea</i>							
Nierefugialne/ <i>Non-refugial</i>	24	32,24 (1,15)	0,15 (0,004)	1,54 (0,06)	0,13 (0,006)	44,07 (0,62)	48,61 (0,57)
Refugialne/ <i>Refugial</i>	11	36,00 (2,85)	0,15 (0,004)	2,47 (0,33)	0,16 (0,007)	40,98 (1,16)	45,00 (1,45)
Błąd I rodzaju/ <i>I-type error</i>		0,15	0,55	0,002*	0,05	0,03	0,01

* - test U Manna-Whitneya / *Mann-Whitney U test*



Ryc. 5. a – Rozmieszczenie badanych populacji *Stellaria holostea* w Karpatach i obszarach przyległych. **b** – Rozmieszczenie w polskich Bieszczadach Zachodnich. Numery populacji odpowiadają ich kolejności w Tabeli 1.

Fig. 5. a – Distribution of populations under study of *Stellaria holostea* in the Carpathians and adjoin regions. **b** – distribution in Polish Western Bieszczady Mts. The numbering of populations follow those in Table 1.

Tabela 4. Charakterystyka populacji *Stellaria holostea* w Karpatach i obszarach przyległych. n – liczebność próby, Wys. – położenie m.n.p.m., N – długość geograficzna, E – szerokość geograficzna, PPL – procent prążków polimorficznych, h – wskaźnik różnorodności genowej Neia, DW – wskaźnik genetycznej dywergencji populacji, FA – średnia liczba prążków u osobnika w populacji, $FAMax$ – maksymalna liczba prążków u osobnika w populacji.

Table 4. Characteristics of populations of *Stellaria holostea* in the Carpathians and adjoining regions. n – sample size, $Alt.$ – altitude m.a.s.l., N – longitude, E – latitude, PPL – percent of polymorphic bands, h – Nei's gene diversity, DW – genetic divergence index, I – Shannon's index of diversity, FA – mean number of AFLP bands in the population, $FAMax$ – maximum number of AFLP bands in the population.

Nr No.	Kod Code	Stanowisko Locality	Region* Region*	n	N	E	Wys. Alt.	PPL	h	DW	I	FA	$FAMax$
1	CE	Cepari	EC	3	47 14	24 25	350	29,4	0,1487	1,426	0,120	42,0	44
2	DE	Galgau	EC	3	47 16	23 43	250	32,2	0,1663	1,761	0,143	45,0	50
3	SY	Syhot Marmaroski	EC	3	47 55	23 52	380	31,0	0,1614	1,105	0,142	43,0	52
4	CO	Cosatui	EC	3	47 52	24 04	410	26,9	0,1389	2,053	0,107	42,3	44
5	SA	Şapanta	EC	3	47 58	23 43	245	31,4	0,1613	4,232	0,142	42,7	45
6	MI	Moravany	EC	3	48 44	21 49	150	28,6	0,1434	1,348	0,108	44,0	50
7	HA	Hajnačka	PA	2	48 15	19 57	270	26,9	0,1540	1,532	0,086	48,5	50
8	KR	Krościenko n/Dunajcem	WC	4	49 27	20 26	485	29,8	0,1398	1,951	0,121	48,3	51
9	KU	Kurinec	PA	2	48 21	20 00	250	27,3	0,1663	1,778	0,104	46,0	46
10	TV	Teply Vrch	PA	3	48 28	20 05	210	29,8	0,1540	1,768	0,136	40,7	43
11	SAH	Šahy	PA	5	48 03	18 57	150	42,0	0,1696	2,247	0,188	45,8	47
12	HO	Hutyisko	Podole	3	49 24	24 50	390	32,7	0,1641	1,673	0,131	47,0	50
13	CH	Chelm	Polesie	3	51 06	23 30	188	27,3	0,1310	1,275	0,091	45,7	47
14	ZW	Zwierzyniec	Roztocze	3	50 37	22 58	250	28,6	0,1370	1,492	0,096	46,3	53
15	SW	Swoszowice	SB	5	49 59	19 57	290	32,7	0,1387	1,328	0,137	44,0	50
16	PN	Lipówka	SB	5	50 05	20 22	198	40,4	0,1527	2,726	0,172	40,8	46

17	ZO	Zarszyn	ECF	3	49 33	21 59	375	23,3	0,0658	1,534	0,038	50,3	52
18	GG	Gilowa Góra	ECF	3	49 51	21 12	425	31,8	0,1612	1,543	0,150	41,0	49
19	PR	Pratkowce	ECF	5	49 45	22 41	400	34,7	0,1417	1,796	0,134	46,2	51
20	DR	Niedźwiedza	ECF	5	49 24	23 26	350	38,8	0,1519	1,429	0,158	43,4	47
21	BE	Bečlean	TR	4	47 11	24 12	270	31,8	0,1487	1,520	0,135	44,8	50
22	CS	Cehu Silvaniei	TR	3	47 25	23 10	285	26,1	0,1376	0,864	0,122	36,3	46
23	RO	Romuli	TR	3	47 31	24 25	560	26,1	0,1373	0,985	0,112	39,3	48
24	BKB	Kińczyk Bukowski	B	9	49 02	22 48	1120	49,8	0,1551	1,462	0,199	45,1	52
25	KRZ	Krzemień	B	4	49 05	22 44	1175	28,2	0,1405	2,578	0,171	36,0	38
26	BRS	Rozsypaniec Stunski	B	5	49 01	22 49	1118	35,5	0,1478	1,265	0,162	41,4	47
27	BB	Berežki	B	3	49 07	22 40	650	35,9	0,1790	1,735	0,146	49,7	54
28	BP	Polonina Wełtińska	B	3	49 10	22 29	1060	28,6	0,1440	1,523	0,110	43,3	47
29	PW	Polonina Wełtińska	B	10	49 09	22 28	774	51,0	0,1363	1,860	0,187	38,3	45
30	DM	Dolina Moczarnego	B	3	49 07	22 29	730	30,6	0,1576	1,421	0,129	44,3	48
31	PC	Polonina Caryńska	B	5	49 08	22 36	1135	33,5	0,1305	1,754	0,130	38,8	43
32	BRO	Rozsypaniec	B	6	49 04	22 47	960	38,8	0,1477	1,348	0,171	41,7	52
33	SIW	Sine Wiry	B	4	49 15	22 25	540	35,1	0,1546	1,798	0,149	43,3	48
34	NS	Nova Sedlica	B	4	49 03	22 29	530	35,1	0,1497	2,312	0,148	40,8	43
35	RU	Ruske	B	6	49 00	22 24	330	44,5	0,1612	2,130	0,197	44,7	48

* SB – Kotlina Sandomierska/Sandomierz Basin, TR – Siedmiogród/Transilvania, EC – Karpaty Wschodnie/Eastern Carpathians, ECF – Pogórze Karpat Wschodnich/Foothills of Eastern Carpathians, PA – Nizina Węgierska/Pannonian Basin, B – Bieszczady/Bieszczady Mts, WC – Karpaty Zachodnie/Western Carpathians

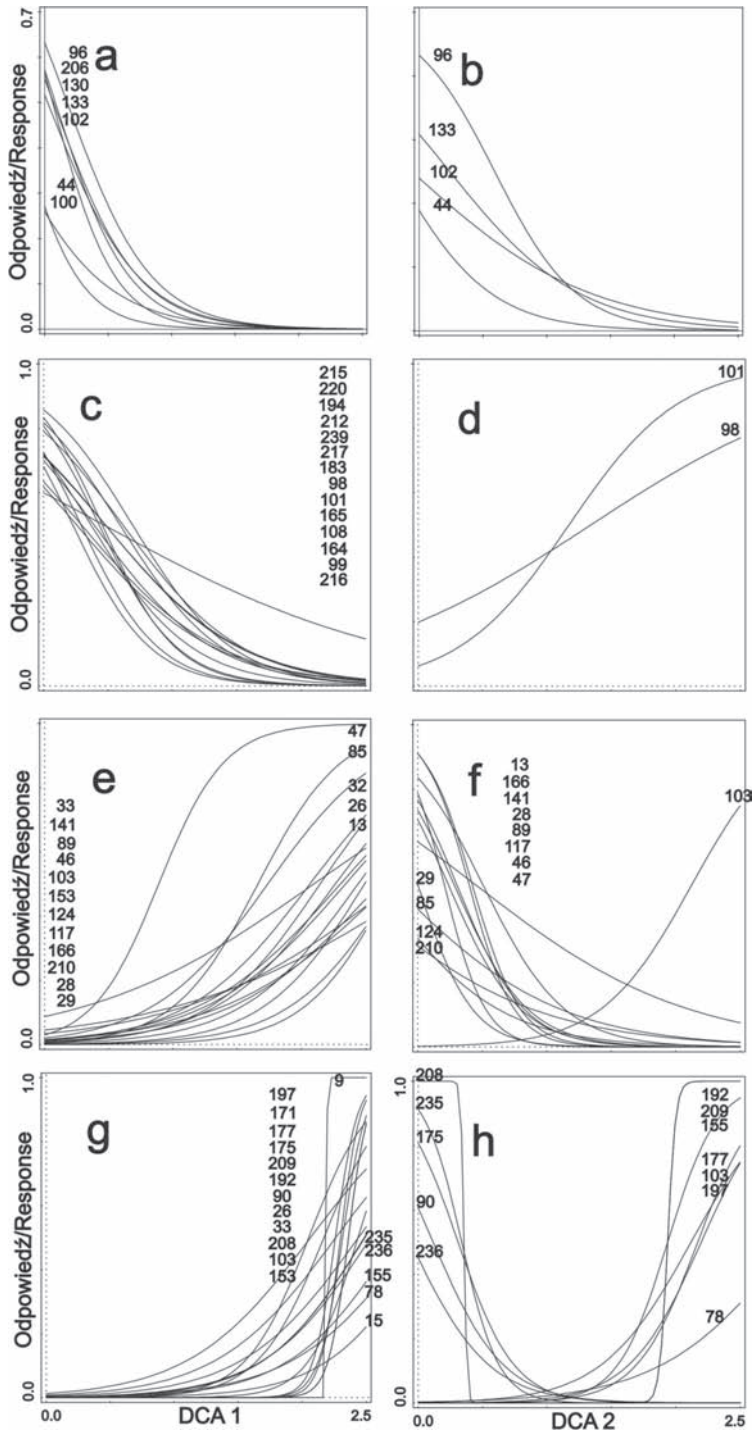
Populacja bieszczadzka *S. holostea* nie różni się statystycznie ($p = 0,18$) od reszty badanego obszaru pod względem podziału wariancji molekularnej AMOVA na składową międzygrupową i wewnątrzgrupową (Tabela 2).

Najwyższą wartość wskaźnika zróżnicowania genetycznego h odnotowano w Bieszczadach Zachodnich (BBE, 0,1790), Nizinie Węgierskiej (SAH – 0,1696) i Karpatach Wschodnich (DE – 0,1664). Najniższą wartość tego wskaźnika stwierdzono w populacji z pogórza Karpat Wschodnich (0,0658 – ZO). Największą wartość wskaźnika dywergencji DW stwierdzono w populacji SAP (4,232 – Karpaty Wschodnie), w populacjach bieszczadzkich: BK (2,578) i NS (2,312) oraz na Nizinie Węgierskiej SAH (2,247) i w Kotlinie Sandomierskiej PN (2,726); najniższą w populacji CS – 0,864 (Siedmiogród, Tabela 2). Największą średnią liczbę prążków AFLP w populacji, wskaźnik FA , stwierdzono w populacji ZO (50,3 – Pogórze Karpat Wschodnich), najniższą w populacji BKR (36,0 – Bieszczady Zachodnie). Najwyższą maksymalną liczbę prążków przypadającą na osobnika F_{max} odnotowano w populacji BBE (54 – Bieszczady Zachodnie), najniższą w populacji BK (38 – Bieszczady Zachodnie).

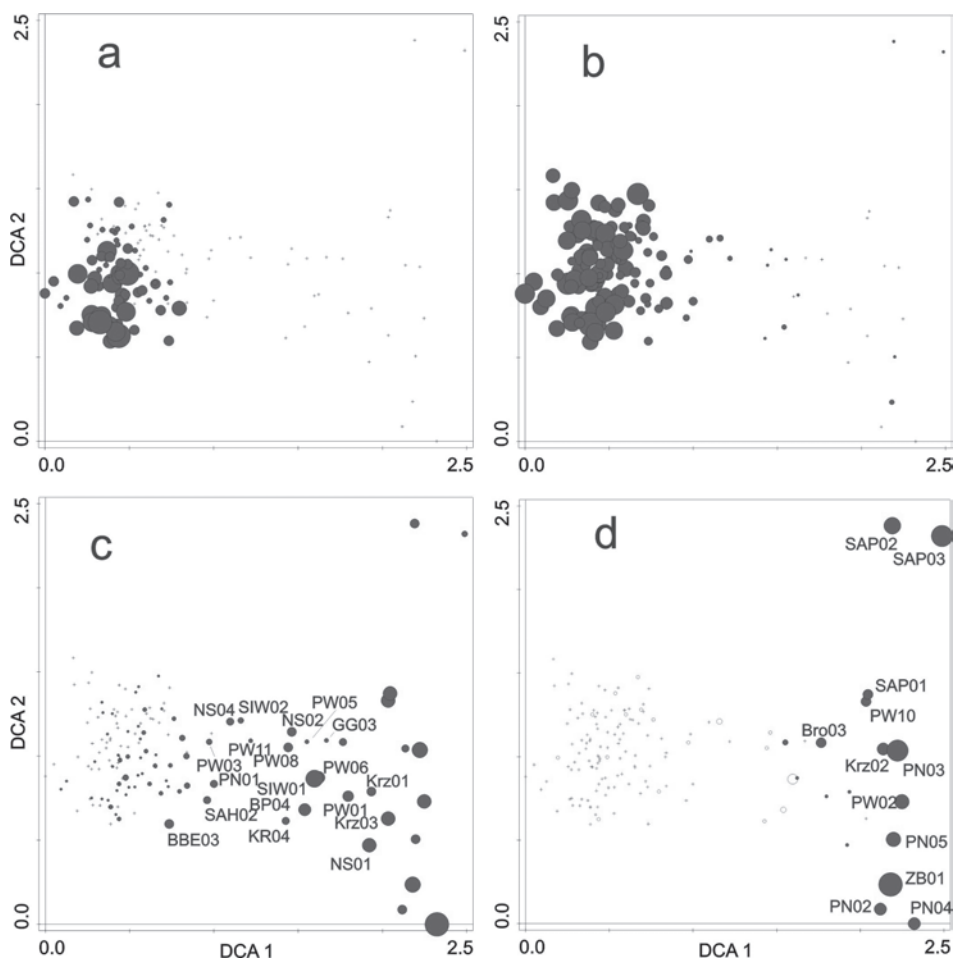
Analizy GLM 141 okazów i 219 prążków AFLP wykazały istnienie czterech grup genetycznych *Stellaria holostea* w badanym obszarze (Ryc. 6). Najbardziej odrębna grupa C charakteryzuje się 18 wspólnymi prążkami AFLP (Ryc. 7d). W jej skład wchodzi okazy grupujące się po prawej stronie osi 1 DCA. Reprezentują one prążki stwierdzone u okazów rosnących w Bieszczadach Zachodnich (BRO03, PW02, PW10, KRZ02), Karpatach Wschodnich SAP01-03 i Kotlinie Sandomierskiej PN02-PN04. Do wymienionej grupy nawiązuje przejściowa grupa A/C (Ryc. 7c). Jest ona charakterystyczna dla środkowego położenia wzdłuż osi 1 DCA i składa się z następujących okazów: Bieszczady Zachodnie BP04, NS02, NS04, PW04, PW08-09, PW11, SIW01-02, SIW04, Karpaty Wschodnie DE02, Nizina Węgierska SAH02, Karpaty Zachodnie KR04 i Kotlinia Sandomierska PN01. Przeciwnie kraniec osi 1 DCA (po lewej stronie wykresu) zajmuje grupa A, charakteryzująca się niewielką liczbą siedmiu prąż-

Ryc. 6. Uogólniony model liniowy GLM dla grup genetycznych A, A/B, B/C i C prążków AFLP *Stellaria holostea* wzdłuż dwóch pierwszych osi DCA. **a** – GLM dla grupy genetycznej A, oś 1 DCA; **b** – GLM dla grupy genetycznej A, oś 2 DCA; **c** – GLM dla grupy genetycznej A/B, oś 1 DCA; **d** – GLM dla grupy genetycznej A/B, oś 2 DCA; **e** – GLM dla grupy genetycznej B/C, oś 1 DCA; **f** – GLM dla grupy genetycznej B/C, oś 1 DCA; **g** – GLM dla grupy genetycznej C, oś 1 DCA; **h** – GLM dla grupy genetycznej C, oś 2 DCA; numery oznaczają prążki AFLP z statystycznie istotną odpowiedzią ($p \leq 0,05$).

Fig. 6. Generalized Linear Models (GLMs) for genetic Groups A, A/B, B/C and C of AFLP bands of *Stellaria holostea* along the first two Axes of DCA. **a** – GLMs for genetic Group A, DCA Axis 1; **b** – GLMs for genetic Group A, DCA Axis 2; **c** – GLMs for genetic Group A/B, DCA Axis 1; **d** – GLMs for genetic Group A/B, DCA Axis 2; **e** – GLMs for genetic Group B/C, DCA Axis 1; **f** – GLMs for genetic Group B/C, DCA Axis 1; **g** – GLMs for genetic Group C, DCA Axis 1; **h** – GLMs for genetic Group C, DCA Axis 2; numbers denote AFLP bands with statistically significant ($p \leq 0.05$) responses.



ków stwierdzonych u odległych geograficznie populacji (Ryc. 7a). Do tej grupy należą okazy pochodzące z następujących regionów: Bieszczadów Zachodnich BB01-03, BKB03, BKB05, BKP01, PW01, PW03-04, BRS03-05, PC01-04, słowackich Karpat Wschodnich MI01-03, rumuńskich Karpat Wschodnich COS01-03, DE03, pogórza ukraińskich Karpat Wschodnich DR03, DR05-06, pogórza Polskich Karpat Wschodnich GG02, PR01, PR03, PR05, ZO01-03, Podola HO01, Karpat Zachodnich KR02-03, KR05, Niziny Węgierskiej SAH01, SAH03-04, TV03 i Roztocza ZW03, ZW08,



Ryc. 7. Rozmieszczenie 141 okazów *Stellaria holostea* wzdłuż dwóch pierwszych osi DCA wraz z zaznaczoną częstością występowania poszczególnych grup genetycznych; **a** – grupa genetyczna A; **b** – grupa A/B; **c** – grupa B/C; **d** – grupa C.

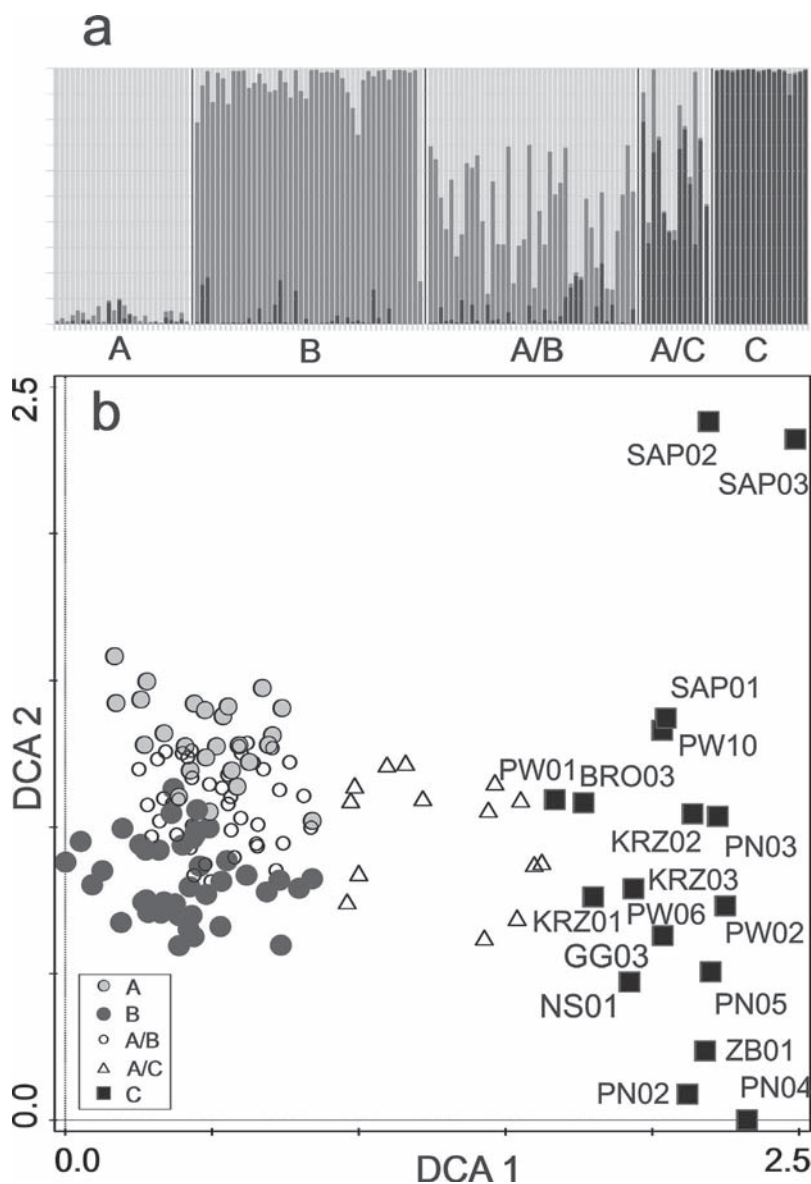
Fig. 7. Distribution of 141 specimens of *Stellaria holostea* along the first two Axes of DCA with the frequency of occurrence of particular genetics groups; **a** – genetic Group A; **b** – Group A/B; **c** – Group B/C; **d** – Group C.

ZW10. Grupa A/B również charakteryzuje występowaniem w odległych populacjach (Ryc. 7b). Obok wymienionych należą tu jeszcze: BE0-04, CS01-03 (Transylwania), CE001, CE03-4, SYM01-03 (Karpaty Wschodnie), CH01, CH05, CH10 (Polesie), DM01-03, BRO01, BRO03, BRO05, ROZ01, ROZ03, RU01-04 (Bieszczady Zachodnie), HA01, HA03 (Nizina Węgierska), SW1-05 (Swoszowice, próg Karpat na południu Krakowa).

Analiza STRUCTURE potwierdziła wyróżnienie grup genetycznych na podstawie GLM (Ryc. 8). Różnica dotyczy podziału grup A i A/B na trzy grupy: A, A/B i B. Grupa A (według podziału GLM) została teraz rozdzielona i jej część przeszła do grupy A/B. Nowa grupa A według STRUCTURE obejmuje populacje: BE (Siedmiogród), CE (Karpaty Wschodnie), BRO, RU (Bieszczady Zachodnie) i SW (próg Karpat Zachodnich), natomiast grupa A/B: BKB, BP, DM, PW, SIW (Bieszczady Zachodnie), CH (Polesie), CS, RO (Transylwania), DR (pogórze Karpat Ukraińskich), PR (pogórze Polskich Karpat Wschodnich), HO (Podole), SYM (Karpaty Wschodnie) i TV (Nizina Węgierska). Różnice w grupach A/C i C w obydwu podziałach (GLM i STRUCTURE) są nieznaczne (Ryc. 7 i 8b).

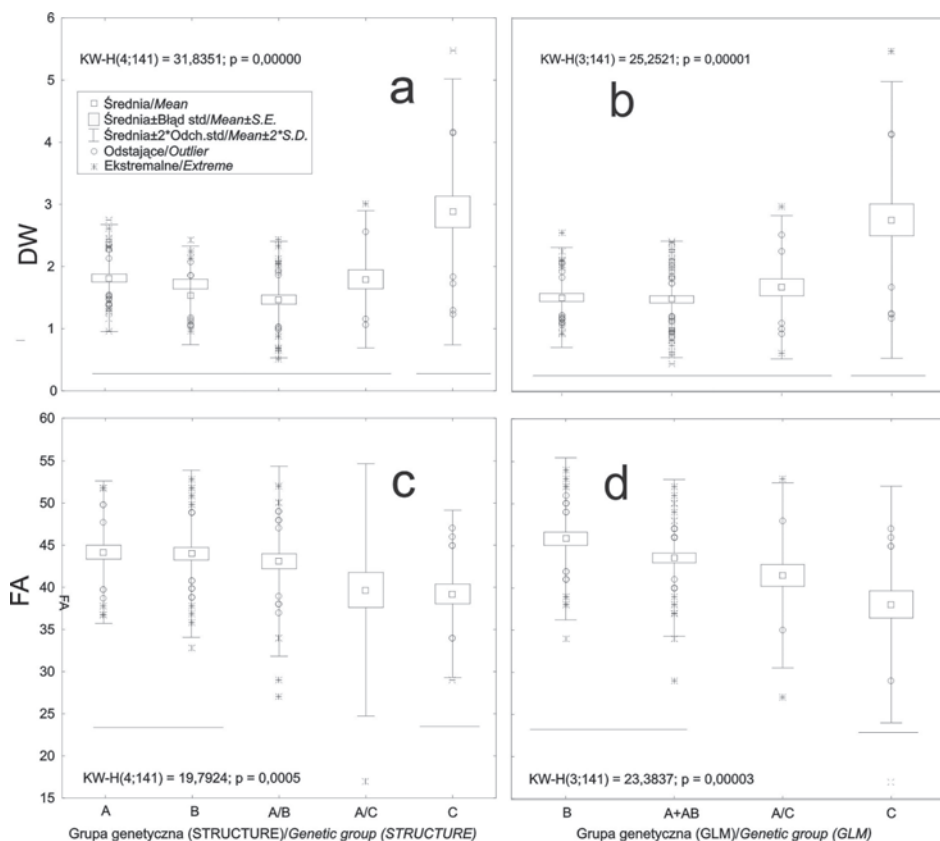
Dla wykazania różnic wskaźników *DW* i *FA* pomiędzy grupami genetycznymi według podziału GLM i STRUCTURE przeprowadzono test istotności różnic średnich za pomocą nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa. W przypadku obydwu wskaźników uzyskano wynik wskazujący na istotność statystyczną wskaźników zróżnicowania genetycznego *DW* i *FA* w grupie C. W przypadku wskaźnika *DW* były to wartości najwyższe, natomiast *FA* – najniższe spośród wszystkich wyróżnionych grup genetycznych (Ryc. 9).

Algorytm NJ grupuje populacje częściowo zgodnie z wyróżnionymi grupami genetycznymi (Ryc. 10). Najlepiej poparta (93%) jest grupa C obejmująca populacje BK, PN, PW i SAP. Równie wysoki stopień poparcia uzyskała grupa A/C (79–99%), za wyjątkiem populacji DE, która tworzy grupę siostrzaną z 23% poparcia. Grupa C nie wykazuje retikulacji, podobnie jak grupa A/C, za wyjątkiem SIW, połączoną retikulacją z RU (Bieszczady Zachodnie). Najwięcej połączeń (cztery) posiada ZO (pogórze Karpat Wschodnich) z CH (Polesie), SW – HA (próg pogórze Karpat Zachodnich – Nizina Węgierska), PR (pogórze polskich Karpat Wschodnich) i BP (Bieszczady Zachodnie). Na podstawie uzyskanego drzewa NJ można wyróżnić grupę populacji *S. holostea* o przypuszczalnym refugialnym charakterze. Obejmuje ona genetyczne grupy C i A/C wyróżnioną według analizy GLM i STRUCTURE. Należą tu populacje z Bieszczadów Zachodnich: KRZ (Krzemień), PW (Połonina Wetlińska), NS (Nova Sedlica), SIW (Sine Wiry), z Karpat Wschodnich DE (Galgau) i SA (Šapanta) oraz populacja spoza Karpat z Kotliny Sandomierskiej w Puszczy Niepołomickiej PN. Tworzą one przypuszczalną grupę refugialną, która statystycznie istotnie ($p < 0,001$) odróżnia się od grupy nierefugialnej, a ich składowa międzygrupowa AMOVA wynosi 11,2% (Tabela 2).



Ryc. 8. Analiza STRUCTURE 141 okazów *Stellaria holostea* w Karpatach i terenach przyległych. **a** – STRUCTURE; **b** – rozmieszczenie grup genetycznych A, B, A/B, A/C i C według STRUCTURE w osiach DCA. Uwzględniono prążki ISSR (oznaczone numerami) z istotną odpowiedzią ($p \leq 0,05$) w poszczególnych osiach DCA.

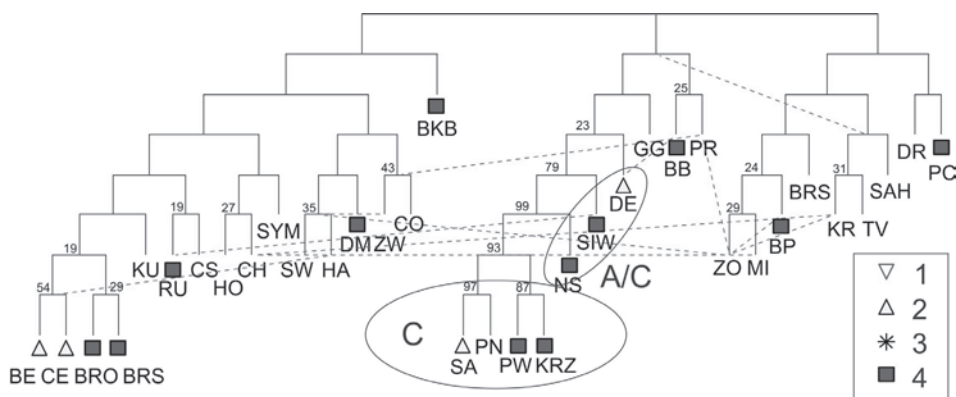
Fig. 8. STRUCTURE analysis of 141 specimens of *Stellaria holostea* in the Carpathians and adjoin regions. **a** – STRUCTURE; **b** – distribution of genetic Groups A, B, A/B, A/C and C according to STRUCTURE in Axes of DCA. Only AFLP bands (denote with numbers) with significant responses ($p \leq 0.05$) in particular Axes of DCA are considered.



Ryc. 9. Nieparametryczny test H Kruskala-Wallisa dla dywergencji prążków AFLP (wskaźnika DW) i liczby prążków (FA) dla grup genetycznych u *Stellaria holostea*. **a** – wskaźnik DW, STRUCTURE; **b** – wskaźnik DW, GLM; **c** – wskaźnik FA, STRUCTURE; **d** – wskaźnik FA, GLM. Kontrasty a posteriori (linie ciągłe u dołu ryciny, $p \leq 0,05$) obliczono za pomocą testu Tukeya najmniejszej istotnej różnicy dla nierównych liczebności próby (Statistica 10, StatSoft).

Fig. 9. Non-parametric the Kruskal-Wallis H test for the divergence of AFLP bands (DW index) and number of bands (FA) for genetic groups in *Stellaria holostea*. **a** – DW index, STRUCTURE; **b** – DW index, GLM; **c** – FA index, STRUCTURE; **d** – FA index, GLM. Contrasts a posteriori (lines at the bottom of figure, $p \leq 0,05$) were calculated with Tukey's HSD test for unequal sample sizes (Statistica 10, StatSoft).

Tak wyróżniona, przypuszczalna grupa refugialna *S. holostea* charakteryzuje się istotnie niższym bogactwem genetycznym FA ($p = 0,03$) i FA_{max} ($p = 0,01$) oraz wyższym poziomem dywergencji genetycznej DW ($p = 0,002$) i różnorodności Shannona I ($p = 0,05$). Brak różnic w przypadku wskaźników PPL ($p = 0,15$) i h ($p = 0,55$) (Tabela 3).



Ryc. 10. NJ klasyfikacja z retikulacjami 35 populacji *Stellaria holostea* w Karpatach i terenach przyległych, na podstawie odległości genetycznych *Nei*. Nazwy populacji jak w Tabeli 2. Przynależność do grup genetycznych A, A/C, B i C według STRUCTURE. Liczby w węzłach oznaczają wartości bootstrap określone na podstawie 1000 permutacji. Opis legendy jak w Ryc. 4.

Fig. 10. NJ classification with reticulations of 35 populations of *Stellaria holostea* in the Carpathians and adjoin regions, based on *Nei*'s genetic distances. Names of population like those in Table 2. Genetic membership of Groups A, A/C, B and C according to STRUCTURE. Number in nodes denote bootstrap values based on 1000 permutations. Description of legend as in Fig. 4.

Dyskusja

Uwagi ogólne

Celem badań, jak zaznaczono we wstępie, było pochodzenie gatunków grądowych powyżej górnej granicy lasu w Bieszczadach Zachodnich oraz test hipotez dotyczących ich struktury genetycznej. Wykorzystano dwa klasyczne modele biogeografii historycznej: dyspersalizmu i wikaryzmu geograficznego. Pierwszy zakłada pojawienie się na danym obszarze *de novo* osobników z mniej lub bardziej odległych obszarów wyjściowych (refugialnych). W drugim przyjmuje się wtórny podział pierwotnego areалу geograficznego na oddzielone barierami geograficznymi wyspy zasięgowe. Pierwszy model implikuje hipotezę holocenijskich migracji, drugi istnienia refugium glacialnych. Krzyżowanie się dróg migracji polodowcowych w danym obszarze skutkuje wysokim poziomem bogactwa genetycznego w powstających *de novo*, czyli nierefugialnych populacjach. Jak się wydaje proces ten obrazują wskaźniki *FA* i *F_{max}* (Sutkowska i in. 2014). Wynik ten znalazł potwierdzenie w przypadku *S. holostea*, której populacja ZO na pogórzu polskich Karpat Wschodnich posiadała największą liczbę połączeń (retikulacji) w drzewie NJ oraz największą wartość wskaźnika bogactwa genetycznego *FA*. Wskazuje to na istnienie w tym obszarze zjawiska tygla genetycznego. Przeciwnie, przetrwanie ostatniego zlodowacenia przez gatunek leśny w lokalnym refugium powoduje

utrwalenie jego tożsamości genetycznej, wyrażonej wskaźnikiem dywergencji DW , w powiązaniu jednak z ogólnym obniżeniem wskaźników bogactwa genetycznego FA i F_{Amax} , wskutek przejścia przez wąskie gardło ekologiczne i genetyczne. Proporcja loci polimorficznych PPL jest niewrażliwa na zmiany populacyjne, a współczynnik zróżnicowania genowego h wskazuje w sposób umiarkowany na genetyczne wąskie gardło spadkiem wartości dla loci neutralnych (Widmer, Lexer 2001).

Otrzymane wyniki mogą podlegać interpretacji pod warunkiem spełnienia trzech warunków wymienionych w Materiałach i Metodach (Apostol i in. 1996). W rzeczywistości są one niesprawdzalne i dlatego wnioski posiadają charakter hipotetyczny. Problem ten dotyczy wszystkich prac filogeograficznych, chociaż nie jest w nich szczególnie podnoszony. Jednak mniejsza lub większa spójność publikowanych dotychczas wyników badań przekonuje, iż najważniejsze założenie, tj. homologiczność prążków o jednakowej długości, jest w pewnym zakresie spełnione, a wyniki uzyskane w niniejszej pracy nie odbiegają od przyjętych standardów powtarzalności wyników.

W związku z powyższym przyjęto, iż nie tylko osobniki, lecz również grupy prążków AFLP (allele) posiadają rozmieszczenie geograficzne. Najbardziej interesujące są prążki pojawiające się u osobników w odległych geograficznie populacjach. Ich obecność może być wynikiem przypadku lub śladem dawnej historii. W tym kontekście wprowadzono pojęcie „grupy prążków prawdopodobnie o charakterze reliktowym”. Ich występowanie dotyczy niejednokrotnie odległych geograficznie populacji. Dla ich wyróżnienia zastosowano analizę GLM, która pozwala na określenie typów wzorców rozmieszczenia (grup genetycznych) prążków AFLP u badanych osobników, z określeniem ich istotności statystycznej. Jest to pogrupowanie prążków według wspólnych norm reakcji wzdłuż poszczególnych osi DCA. Jak wykazano w niniejszej pracy, wyniki GLM pokrywają się ściśle z rezultatami Bayesowskiej analizy STRUCTURE. GLM dostarcza jednak dodatkowej informacji, niedostępnej w STRUCTURE, tj. dotyczącej wzorców rozmieszczenia poszczególnych prążków AFLP (alleli) wzdłuż hipotetycznych gradientów określonych przez osie DCA. Z drugiej strony, STRUCTURE wskazuje na przypuszczalnie mieszańcowe powstanie osobników, czego nie można wywnioskować z GLM.

Galium schultesii

Analiza GLM wykazała na istnienie 8 osobników gatunku charakteryzujących się unikatowością występowania grupy kilkunastu prążków, określonych jako genetyczna grupa A (Ryc. 2). Znalazły się w niej okazy pochodzące z odległych od siebie obszarów: z Bieszczadów Zachodnich (BK – Kopy Bukowskiej) i Piatra Craiului (PC – Karpaty Południowe), które posiadały wspólne prążki z okazami pochodzącymi z Karpackiego Rezerwatu Biosfery w Małej Uholce

(UM) na Zakarpaciu. Zgodnie z przyjętymi założeniami metodycznymi można przypuszczać, iż są to prążki o charakterze reliktowym. Ich występowanie może wskazywać na odległe w czasie powiązania genetyczne. Zważywszy na niewielkie prawdopodobieństwo przypadkowego pojawienia się tych samych prążków u osobników oddzielonych od siebie o setki kilometrów, hipoteza, że reprezentują wikaryzm geograficzny lub zmienność klinalną, jest wysoce prawdopodobna.

Przypuszczalnie reliktowa grupa B rozciąga występowanie wspólnych alleli (prążków) o dodatkowe okazy pochodzące z połonin bieszczadzkich: z Rabiej Skały RS i Rozsypańca Stinskiego BRS, które wykazują związek z Zakarpaciem UM. Populacja zakarpacka posiada związki genetyczne z populacją PU na Przełęczy Użockiej oraz z Piatra Craiului (Karpaty Wschodnie) Analiza molekularnej wariacji wykazała, iż populacje które utworzyły ugrupowanie w klasyfikacji NJ, przypuszczalnie refugialne, charakteryzują się statystycznie istotną odrębnością w relacji do pozostałych populacji, ujętych jako grupa nie-refugialna ($p = 0,006$).

Jest interesujące, iż *G. schultesii* w populacjach przypuszczalnie refugialnych posiada większą różnorodność genetyczną wyrażoną wskaźnikami różnorodności Shannona I i zróżnicowania genowego h , niż grupa populacji nierefugialnych. Być może jest to wynik braku przejścia populacji gatunku o charakterze refugialnym przez ekologiczne i genetyczne wąskie gardło.

Klasyfikacja NJ populacji wskazuje na związek Bieszczadów Wschodnich (PU Zhornava) i Bieszczadów Zachodnich (BK Kopia Bukowska) z Zakarpaciem (UM Mała Uholka). Populacja RS z Rabiej Skały jest również związana genetycznie z Zakarpaciem (UM Mała Uholka) i posiada retikulację z populacją GH w Górach Kelemeńskich (Karpaty Wschodnie). Równocześnie populacja ta tworzy grupę siostrzaną z populacją MU z Małej Uholki o umiarkowanym wsparciu 66%.

Uzyskany rezultat wskazujący związki populacji z obszaru Wschodnich Karpat, obejmujący region Bieszczadów, Zakarpacia i Piatra Craiului, przy jednoczesnym braku oznak przejścia populacji przez genetyczne wąskie gardło, może być interpretowany jako oznaka istnienia rozczłonkowanego, chociaż rozległego refugium gatunku (*diffuse microrefugia*, Rull 2010). Podobny wynik uzyskano w przypadku grabu *Carpinus betulus* (Mitka i in., w przyg.). Populacje bieszczadzkie (BK Kopa Bukowska i RS Rabia Skała) wchodzą w skład odrębnych grup NJ, a to co je wyróżnia to wspólne prążki, o przypuszczalnym charakterze reliktowym, z populacją na Zakarpaciu. Może to być rezultat związków genetycznych wykraczających czasowo poza okres ostatniego zlodowacenia, sugerujący wikaryzm geograficzny i związany z nim ich refugialny charakter.

Stellaria holostea

Gatunek ten posiada zbliżony do poprzedniego gatunku wzorec ekspresji zmienności genetycznej wyrażonej na podstawie rozmieszczenia okazów wzdłuż osi DCA. Charakteryzuje się on obecnością grupy prążków grupy C, łączącej populacje gatunku pochodzące z różnych obszarów geograficznych. Różnica z poprzednim gatunkiem polega na ich szerszym geograficznym występowaniu, wykraczającym poza region Karpat Wschodnich.

Do grupy genetycznej C należą zarówno populacje bieszczadzkie (KRZ Krzemień, PW Połonina Wetlińska, NS Nova Sedlica, SIW Sine Wiry), wschodniokarpackie (SA Šapanta, DE Galgau), jak i niżowe (PN Puszcza Niepołomicka – rezerwat Lipówka). Tak szerokie rozmieszczenie geograficzne, obejmujące zarówno obszary górskie i niegórskie, może być wynikiem wikaryzmu geograficznego, sięgającego odległych czasów lub migracji gatunku na tereny niżowe z rozległego refugium wschodniokarpackiego. Większość osobników w tych populacjach charakteryzuje się wysokimi wartościami wskaźnika dywergencji *DW*, często przekraczającymi wartość 2, a w Bieszczadach niskimi wartościami wskaźnika *FA* w granicach 34–43. Jest to prawdopodobnie spowodowane ich przetrwaniem podczas LGM w lokalnych górskich refugiach i obecnie reliktowym charakterem. Wyjątkiem jest populacja z Puszczy Niepołomickiej, która posiada, podobnie jak pozostałe populacje niżowe w Polsce CH Chełm (Polesie), ZW Zwierzyniec (Roztocze), SB Swoszowice (Kraków – próg Karpat), wysokie wartości wskaźnika bogactwa genetycznego *FA*, mieszczące się w granicach 46–53. Jest to prawdopodobnie wynik genetycznego tygla (*melting pot*), czyli ich bogactwa genetycznego wynikającego z translokacji alleli pochodzących z różnych refugiów. Niemniej jednak silnie poparte w 97% (NJ) genetyczne związki populacji z Gór Marmaroskich Šapanta (SA, rumuńskie Karpaty Wschodnie) z populacją PN w Puszczy Niepołomickiej potwierdzają hipotezę o prawdopodobnym istnieniu w tym regionie Europy rozległego glacialnego makrorefugium gatunku leśnego *S. holostea*. Obrazu dopełniają liczne retikulacje pomiędzy odległymi geograficznie populacjami wykazane w klasyfikacji NJ.

Wysokie wartości wskaźnika dywergencji genetycznej *DW* i wskaźników zróżnicowania genetycznego *PPL* i wskaźnika Shannona *I* u *S. holostea* w Puszczy Niepołomickiej mogą być wynikiem zarówno ograniczonego użytkowania gospodarczego (jest jeden z najlepiej zachowanych płatów naturalnego grądu w Polsce), jak i efektem spotkania się licznych szlaków migracyjnych w Holocenie (*melting pot*). Badania nad zmiennością genetyczną *S. holostea* wykazały większe zróżnicowanie genetyczne populacji gatunku w miejskich lasach słabo użytkowanych gospodarczo, w porównaniu do silnie eksploatowanych (Wodkiewicz, Gruszczyńska 2014).

Dobrze zdefiniowana genetycznie, chociaż geograficznie zróżnicowana grupa populacji charakteryzowana przez grupę C, posiada średnio najwyższy

współczynnik rzadkości występowania prążków *DW* i najniższą liczbę prążków na osobnika, wskaźnik *FA*. W przypadku populacji karpackich wyjaśnieniem może być reliktowość wynikająca z długotrwałej izolacji, połączonej z epizodami wąskiego gardła ekologicznego i genetycznego towarzyszącym znacznym spadkiem liczebności populacji podczas najzimniejszego okresu (pleniglacjału) ostatniego zlodowacenia. Przypuszczalnie refugialna grupa *S. holostea* posiada statystycznie istotnie niższą wartość współczynników bogactwa gatunkowego *FA* ($p = 0,03$) i *F_{Amax}* ($p = 0,01$), w porównaniu do grupy nierefugialnej, co wskazuje na efekt wąskiego gardła.

Grupa genetyczna B dostarcza interesującego przykładu niewielkiej liczby (siedmiu) prążków szeroko reprezentowanych w badanym materiale. Należy tu 8 osobników z Bieszczadów Zachodnich (Bereżki, Krzemień, Połonina Wetlińska, Połonina Caryńska, Rozsypaniec), Słowacji (1 osobnik), rumuńskich Karpat Wschodnich (2 osobniki), pogórza polskich (Gilowa Góra, Prałkowce, Zarszyn) i ukraińskich Karpat Wschodnich (Drohobycz, łącznie 7 osobników), Podola (1), Karpat Zachodnich – Pieniny (2), Niziny Węgierskiej (3) i Roztocza (1 osobnik). Przypuszczalnie jest to grupa prążków o charakterze reliktowym, zważywszy na ich rozległe geograficzne rozmieszczenie, nie wynikające prawdopodobnie z migracji holoceniskich. Gatunek nie posiada przystosowań do dalekiego transportu nasion, z wyłączeniem roznoszenia przez zwierzęta. Niestety, nie da się tego czynnika z całą pewnością wykluczyć jako nieistotnego. Jeśli hipoteza o reliktowym charakterze tej grupy prążków jest prawdziwa, wówczas istnienie lokalnych kryptorefugiów glacialnych gatunku należy poszerzyć o wymienione obszary na północ od Karpat oraz Nizinę Węgierską i Podole/Roztocze.

Grupa B potwierdza wcześniej stwierdzone na przykładzie *Galium schultesii* związki Bieszczadów Zachodnich z rumuńskimi Karpatami Wschodnimi (Cosa-tui – Góry Marmaroskie) oraz dodatkowo z Niziną Pannońską (Šahy). Klasyfikacja NJ sugeruje, że populacja z progu Karpat SW (Swoszowice) może pochodzić z refugium zlokalizowanego na południe od Karpat (HA Hajnačka), natomiast CH (Polesie) z refugium na Podolu (HU – Holica).

Podsumowanie i wnioski

1. Populacje bieszczadzkie badanych gatunków ujęte jako grupa geograficzna nie wyróżniają się genetycznie (AMOVA) na tle pozostałego obszaru objętego badaniami.

2. Niektóre populacje bieszczadzkie *Galium schultesii* posiadają grupę wspólnych prążków AFLP wykazującą łączność z populacją w Małej Uholce w zakarpackiej części Karpat oraz z obszarem Piatra Craiului. Również niektóre populacje bieszczadzkie *Stellaria holostea* wykazują związki z pozostałymi regionami Karpat Wschodnich (Góry Marmaroskie i Kelemeńskie), jak również, nieoczekiwa-

nie, z populacją niżową w Puszczy Niepołomickiej. Obecność prązków u części populacji bieszczadzkich, wspólnych z innymi, często odległymi geograficznie populacjami w Karpatach Wschodnich, gdzie gatunki te mogły przetrwać ostatni pleniglacjał, może być spowodowane ich refugialnym charakterem.

3. Populacje wyróżnione na podstawie analiz GLM i STRUCTURE jako przypuszczalnie refugialne, wśród których dla *G. schultesii* znalazły się bieszczadzkie PU i BK, a dla *S. holostea* KRZ, PW, NS i SIW, posiadają istotną statystycznie składową zróżnicowania międzygrupowego obliczoną na podstawie AMOVA, wynoszącą 4,8% ($p = 0,006$) dla *G. schultesii* i 11,2% ($p < 0,001$) dla *S. holostea*.

4. Analiza statystyczna wykazała, że prawdopodobnie refugialne populacje *S. holostea* przeszły epizod ekologicznego i genetycznego wąskiego gardła, na co wskazują statystycznie istotnie niskie wartości wskaźników bogactwa gatunkowego *FA* ($p = 0,03$) i *F_{Amax}* ($p = 0,01$) oraz wysokie wartości współczynnika dywergencji *DW* ($p = 0.002$), w porównaniu do grupy nierefugialnej. Przypuszczalnie refugialna grupa populacji *G. schultesii* posiada wyższe wskaźniki: polimorfizmu genetycznego: *PPL* ($p = 0.008$), zróżnicowania genowego *h* ($p = 0.037$), Shannona *I* ($p < 0.001$) i współczynnika dywergencji *DW* (0.007), w porównaniu do grupy nierefugialnej.

Podziękowania

Autorzy dziękują recenzentom za krytyczne uwagi dotyczące manuskryptu pracy, która została sfinansowana z grantu NCN nr N N304 071940.

Barbarze Ćwikowskiej dziękujemy za pomoc redakcyjną.

Literatura

- Agresti A. 2007. An introduction to categorical data analysis. 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Apostol B. L., Black IV W. C., Reiter P., Miller B. R. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325–334.
- Avise J. C. 2008. Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa.
- Bonin A., Ehrich D., Manel S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol. Ecol.* 16(18): 3737–3758.
- Boroń P., Zalewska-Gałosz J., Sutkowska A., Zemanek B., Mitka J. 2011. ISSR analysis points to relict character of *Aconitum bucovinense* (Ranunculaceae) at the range margin. *Acta Soc. Bot. Pol.* 80(4): 315–326.
- Dzwonko Z., Loster S. 2001. Wskaźnikowe gatunki roślin starych lasów i ich znaczenie dla ochrony przyrody i kartografii roślinności. *Prace Geograficzne* 178: 120–132.

- Earl D.A., von Holdt B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources vol. 4(2): 359–361 doi: 10.1007/s12686–011–9548–7.
- Ehrich D. 2006. AFLPdat: a collection of r functions for convenient handling of AFLP data. Mol. Ecol. Notes 6: 603–604. RL: [<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471–8286.2006.01380.x>].
- Evanno G., Regnaut S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14: 2611–2620.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. 2010. Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Res. 10: 564–567.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Molecular Ecology Notes 7: 574–578.
- Felsenstein J. 2005. Phylip (Phylogeny Inference Package) version 3.6, University of Washington, Seattle.
- Jankovská V., Pokorný P. 2008. Forest vegetation of the last full-glacial period in the Western Carpathians (Slovakia and Czech Republic). Preslia 80: 307–324.
- Juříčková L., Horáčková J., Ložek V. 2014. Direct evidence of central European forest refugia during the last glacial period based on mollusc fossils. Quaternary Research 82: 222–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yqres.2014.01.015>.
- Kornaś J., Medwecka-Kornaś A. 2002. Geografia roślin. Wydanie nowe. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Legendre P., Makarenkov V. 2002. Reconstruction of biogeographic and evolutionary networks using reticulograms. Systematic Biology 51: 199–216.
- Lynch M., Milligan B. 1994. Analysis of population-genetic structure using RAPD markers. Molecular Ecology 3: 91–99.
- Magri D., Vendramin G.G., Comps B., Dupanloup I., Geburek T., Gömöry D., Latalowa M., Litt T., Paule L., Roure J.M., Tantau I., Van Der Knaap W.O., Petit R.J., De Beaulieu J.L. 2006. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. New Phytol. 171:199–221.
- Magyari E. 2002. Holocene biogeography of *Fagus sylvatica* L. and *Carpinus betulus* L. in the Carpathian-Alpine region. Folia Historico-Naturalia Musei Matraensis 26: 15–35.
- Magyari E.K., Kunes P., Sümegi, P., Pelánková B., Schäbitz F., Braun, M., Chytrý M. 2014a. Late Pleniglacial in eastern-central Europe: are there modern analogues in Siberia? Quaternary Science Reviews 95: 60–79.
- Magyari E.K., Veres D., Wennrich V., Wagner B., Braun M., Jakab G., Karátson D., Pál Z., Ferenczy Gy, St-Onge G., Rethemeyer J., Francois J.P., von Reumont F., Schäbitz F. 2014b. Vegetation and environmental responses to climate forcing during the Last Glacial Maximum and deglaciation in the East Carpathians: attenuated response to maximum cooling and increased biomass burning. Quaternary Science Reviews 106: 278–298.
- Makarenkov V. 2001. T-REX: reconstructing and visualizing phylogenetic trees and reticulation networks. Bioinformatics 17: 664–668.
- Mitka J., Bąba W., Szczepanek K. 2014. Putative forest glacial refugia in the Western and Eastern Carpathians. Modern Phytomorphology 5: 85–92.

- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321–3323.
- Paun O., Schönswetter P., Winkler M., IntraBiodiv Consortium & Tribsch A. 2008. Historical divergence versus contemporary gene flow: evolutionary history of the calcicole *Ranunculus alpestris* group (Ranunculaceae) in the European Alps and the Carpathians. Molecular Ecology 17: 4263–4275.
- Petit R.J., Aguinagalde I., Beaulieu J.L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Muller-Starck G., Demesure-Musch B., Palmé A., Pedro Marti J., Rendell S. & Vendramin G. G. 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. Science 300 (5625): 1563–1565.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.
- Ronikier M. 2011. Biogeography of high-mountain plants in the Carpathians: an emerging phylogeographical perspective. Taxon 60(2): 373–389.
- Rull V. 2010. On microrefugia or cryptic refugia. J. Biogeogr. 37: 1623–1627.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406–425.
- Schönswetter P., Tribsch A. 2005. Vicariance and dispersal in the Alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). Taxon 5: 54–725.
- Shannon C.E., Weaver W. 1949. The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- Stewart J. R., Lister A. M. 2001. Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. Trends Ecol. Evol. 16: 608–613.
- Sutkowska A., Anamthawat-Jónsson K., Magnússon B., Bąba W., Mitka J. 2015. ISSR analysis of two founding plant species on the volcanic island Surtsey, Iceland: grass versus shrub. Surtsey Research 13: 17–30.
- Sutkowska A., Pasierbiński A., Warzecha T., Mitka J. 2014. Multiple cryptic refugia of forest grass *Bromus benekenii* in Europe as revealed by ISSR fingerprinting and species distribution modelling. Plant Syst. Evol. 300: 1437–1452.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cosson J.F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Molecular Ecology 7: 453–464.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28(10): 2731–2739. [<http://www.megasoftware.net/>].
- ter Braak C.J.F., Šmilauer P., 2012. Canoco reference manual and user's guide: software for ordination (version 5.0). Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA, 496 pp.
- Tzedakis P. C., Lawson I. T., Frogley M. R., Hewitt G. M., Preece R.C. 2002. Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. Science 297: 2044–2047.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T. 1999. POPGENE version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Quick user guide. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta.
- Vekemans X. 2002. AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

- Widmer A., Lexer C. 2001. Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends Ecol. Evol.* 16(6): 267–269.
- Willis K. J., Rudner E., Sümegi P. 2000. The full-glacial forests of central and southeastern Europe. *Quaternary Research* 53: 203–213.
- Willis K. J., Van Andel T. H. 2004. Trees or no trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews* 23: 2369–2387.
- Winnicki T., Zemanek B. 2003. Przyroda Bieszczadzkiego Parku Narodowego. Nature in the Bieszczady National Park. Wyd. Bieszczadzkiego Parku Narodowego, Ustrzyki Dolne.
- Winnicki T., Zemanek B. 2014. Przegląd polskich badań botanicznych Karpat Wschodnich oraz rola Bieszczadzkiego Parku Narodowego w ochronie różnorodności szaty roślinnej. *Roczniki Bieszczadzkie* 22: 51–77.
- Wodkiewicz M., Gruszczyńska B. 2014. Genetic diversity and spatial genetic structure of *Stellaria holostea* populations from urban forest islands. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 56(1): 42–53.
- Zhivotovsky L.A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 907–913.

Summary

The problem of the existence of northern cryptic forest refugia in the Carpathians is recently a matter of vigorous scientific debate. Within its scope is the occurrence of broadleaved, temperate forest herbs above the forest tree limit in the Eastern Carpathian Mountains, including the Bieszczady Mts. The occurrence of the lowland species of oak-hornbeam forests (*Carpinion all.*) as *Galium schultesii* and *Stellaria holostea* in the subalpine meadows (poloninas) in the Bieszczady Mts. puzzled the students of the Carpathian flora as early as in the XIX century. This peculiar phenomenon could be explained by two hypotheses. The first deals with the refugial scenario. Accordingly, the forest herbs could have survived the Last Glacial Maximum (LGM) *in situ* in shelter sites in the Eastern Carpathians and then, in warm phases of the glacial-interglacial cycle, expanded from the nuclei. The second hypothesis expresses the classical view that in the LGM temperate forest flora in the Eastern Carpathians were in a great extent exterminated and then re-built from the long-term refugia located in southern Europe. A Europe-wide studies by Petit et al. (2003) showed that genetic pattern of the refugial populations differs from those established *de novo* in the effect of the Late Glacial/Holocene migrations. The refugial/relict populations are characterized by high genetic divergence (*D_W* index) resulting from the long-lasting accumulation of rare alleles in allopatry in different refugial areas. Taking into consideration harsh climatic conditions in the mountains, especially in the LGMs, they could pass episodes of the ecological bottlenecks. In the effect they should be characterized by a low level of genetic richness, especially the number of

AFLP bands per population (*FA*). A special case is when in newly established populations in the deglaciated areas, originated in the effect of lateglacial/postglacial migrations in areas, several migratory routes met. In such a situation the displacement of the information from the various refugia is expected, giving in turn a high genetic population diversity accompanied by low genetic divergence. These two hypotheses were tested with a method of the molecular DNA fingerprinting using AFLP markers. Altogether, twenty nine populations of *G. schultesii* and thirty five populations of *S. holostea* sampled in the Carpathians, Transcarpathia, Pannonian Basin, Transilvania and Podolia were examined (Tables 1 and 4, Figs. 1 and 5). They were characterized by 200 and 219 AFLP loci, respectively. The aim of the work was to find genetic relationships of the Bieszczady's populations with the remaining under study.

The hypotheses were tested with General Linear Models (GLMs) and STRUCTURE analysis. GLM response functions for particular AFLP bands were calculated for the first three axes of a Detrended Corresponding Analysis (DCA) and tested for their statistical significance ($p \leq 0.05$). As a result two types of genetic AFLP responses were obtained for *G. schultesii* (Figs. 2 and 3) and four (GLM) or five (STRUCTURE) for *S. holostea* (Figs. 6–8). Additionally, Neighbour Joining (NJ) clustering with reticulations were carried out (Figs. 4 and 10).

In *G. schultesii* the highest genetic divergence index *DW* was noted in Transcarpathia (UM, 6.674), the Bieszczady's populations: BK (2.783) and BRS (2.416), and in the Southern CC (2.248) and Eastern Carpathians PC (2.081, Table 1). Most genetically diversified populations of *G. schultesii* (Nei's *h* index) were in the Southern Carpathians (0.1667) and in three Bieszczady's populations (0.1602–0.1651). The highest mean number of AFLP bands (*FA*) was noted in NAN (39.0) in Transcarpathia and RS (38.0) in the Bieszczady Mts. The maximum number of AFLP bands per individual (*FA*_{max}) was noted in population KT (44) in the Eastern Carpathian Foothills. An AFLP genetic Group A in *G. schultesii* (Fig. 3) was represented by the Bieszczady Mts. (BK, PU), Transcarpathia UM), and Romanian Eastern Carpathians (PC, Piatra Craiului Mts; Fig. 2). Neighbour Joining (NJ, Fig. 4) put them into one group with a moderate support 79%. This putative refugial group had statistically significant ($p = 0.006$) component of genetic between-group variation (AMOVA) equaled 4,8% (Table 2). It was also characterized by statistically significantly higher *PLP* ($p = 0.008$), Nei's *h* ($p = 0.037$), Shannon *I* ($p < 0.001$), and genetic divergence *DW* ($p = 0.007$) indices (Table 3), in comparison to the non-refugial group.

In *S. holostea* the most genetically diversified (Nei's *h* index) populations were in the Western Bieszczady Mts (0.1790), Pannonian Basin (0.1696) and the Eastern Carpathians (0.1664, Table 4). The highest genetic divergence

index DW was noted in the Romanian Eastern Carpathian (SAP, 4.232) and then in the Bieszczady's populations: BK (2.578) and NS (2.312), in the Pannonian (SAH, 2.247) and Sandomierz Basin PN (2.726, Table 2). The highest mean number of AFLP bands per population FA was found in Transcarpathia (39,0 – NAN) and then in the W Bieszczady (RS – 38.0, RU – 37.3, BT – 37.0), Transilvania (CT – 37.2), and E Carpathians (CM – 37.5). GLMs and STRUCTURE analyses recognized four and five genetic groups, respectively (Figs. 6 – 8). Among them genetic Group C had the highest DW index ($p < 0.001$) and the lowest FA ($p < 0.001$, Fig. 9). NJ clustering restored widely geographically distributed populations representing Group C and A/C with a support of 79% (Fig. 10). This putative refugial group, linked the Bieszczady Mts. (PW, KRZ, NS, SIW), E Romanian Carpathians (DE, SA), and the Sandomierz Basin PN (north of W Carpathians), had statistically significant ($p < 0.001$) component of between-group genetic variation (AMOVA) equaled 11.2% (Table 2). Statistical analysis showed that this putative refugial group of *S. holostea* had statistically significantly lower indices of genetic richness FA ($p = 0.03$) and F_{Amax} ($p = 0.01$), and higher DW ($p = 0.002$) and Shannon I ($p = 0.05$), in comparison to the non-refugial group (Table 3). It probably passed through the genetic bottleneck. The highest number of reticulations and FA index were found in ZO population located in Polish E Carpathian Foothills, proved its status of genetic melting pot.

The results showed that both forest herbs could have persisted the LGM in cryptic refugia in the Bieszczady Mts.