

Muzeum i Instytut Zoologii
Polska Akademia Nauk

Analiza morfologiczna i genetyczna nietoperzy
Pipistrellus pipistrellus* i *Pipistrellus pygmaeus

Anna Katarzyna Sztencel-Jabłonka

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr. hab. Wiesława Bogdanowicza

Warszawa 2009

Projekt częściowo finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa
Wyższego (grant Nr N304 109 32/4040)

K. 35690

<http://rcin.org.pl>

Muzeum i Instytut Zoologii
Polskiej Akademii Nauk
BIBLIOTEKA
K. 35690

D. 48/09-14

Mojemu Tacie

Podziękowania

Za bezinteresowne dzielenie się wiedzą na temat odłowów nietoperzy, lokalizacji kolonii karlików, nieocenioną pomoc w terenie, a także gościnność i niezwykłą życzliwość chciałabym serdecznie podziękować całej rzeszy polskich chiropterologów: Mateuszowi Ciechanowskiemu, Krzysztofowi Kasprzykowi, Krystynie Dzieciołowskiej, Radosławowi Dzieciołowskiemu, Joannie Furmankiewicz, Grzegorzowi Gołębnikowi, Grzegorzowi Lesińskiemu, Michałowi Piskorskiemu, Tomaszowi Postawie, Ireneuszowi Ruczyńskiemu, Rafałowi Szkudlarkowi, Agnieszce Szubert, Radosławowi Urbanowi i Grzegorzowi Wojtaszynowi.

Za udostępnienie prób z Krzyża Wielkopolskiego dziękuję organizacji OTON, a z kolonii znad Jeziora Pisocnego Tomášowi Bartoničce i Zdenkowi Řehákowi (Uniwersytet Masaryka, Brno), którym także dziękuję za wspólne odłowy. Za udostępnienie materiału kostnego dziękuję Garethowi Jonesowi (University of Bristol).

Specjalne podziękowania należą się moim najbardziej wytrwałym pomocnikom podczas nieprzespanych nocy w terenie: Patrycji Jagólkowskiej, Joannie Kohyt i Janowi Jabłonce. Za pomoc w odłowach dziękuję także Przemysławowi Szymroszczykowi i Józefowi Wysińskiemu oraz Ochotniczej Straży Pożarnej z Nowolesia.

Za liczne dyskusje na temat genetyki populacyjnej, porady metodyczne i te dotyczące niezgłębionej natury programów do analiz genetycznych, a także miłą atmosferę pracy (i ciasteczka) dziękuję moim współpracownikom z Pracowni Technik Molekularnych i Biometrycznych: Michałowi Dąbrowskiemu, Patrycji Jagólkowskiej, Annie Terebie, Małgorzacie Pilot i Robertowi Rutkowskiemu. Szczególne podziękowania za wprowadzenie mnie w tajniki technik molekularnych i nieocenioną pomoc w opracowaniu metodyki badań winna jestem Marcie Gajewskiej.

Za uwagi redakcyjne serdecznie dziękuję mojej siostrze Joannie Kumor. A za pomoc i wsparcie moralne mojemu mężowi Janowi.

Za opiekę nad pracą i wiarę w moje umiejętności składam podziękowania mojemu promotorowi Prof. dr. hab. Wiesławowi Bogdanowiczowi. Za uwagi dotyczące morfometrycznej części pracy dziękuję dr. Davidowi Sheetsowi i prof. Jamesowi Rohlfowi, a dr. Chrisowi Klingenbergowi za odpowiedzi na moje wątpliwości dotyczące programu MorphoJ.

Za służbę dla dobra nauki, okupioną bądź, co bądź własną krwią, dziękuję wszystkim odłowionym 368 karlikom.

Spis treści

PODZIĘKOWANIA	5
PRZEDMOWA.....	9
Porównanie budowy czaszki <i>Pipistrellus pipistrellus</i> i <i>Pipistrellus pygmaeus</i> z zastosowaniem metod trójwymiarowej morfometrii geometrycznej	11
STRESZCZENIE	13
WPROWADZENIE.....	15
MATERIAŁ I METODY.....	19
Pomiary	19
Morfometria geometryczna — analiza.....	21
WYNIKI	23
Ocena błędu	23
Wpływ odtwarzania brakujących punktów na analizę dyskryminacji	24
Różnice wielkości	24
Różnice kształtu	26
DYSKUSJA	37
Różnice wielkości	37
Różnice w kształcie.....	40
WNIOSKI.....	45
LITERATURA	47
ZAŁĄCZNIK I „Spis zmierzonych okazów”.....	53
ZAŁĄCZNIK II „Spis zmierzonych punktów homologicznych”.....	55
ZAŁĄCZNIK III „Procedura odtwarzania współrzędnych brakujących punktów homologicznych”.....	59
Analiza zróżnicowania genetycznego populacji <i>Pipistrellus pipistrellus</i> i <i>Pipistrellus pygmaeus</i> w Polsce.....	63
SPIS SKRÓTÓW.....	65
STRESZCZENIE	67
WPROWADZENIE.....	71
MATERIAŁ I METODY.....	79
Zbiór prób	79
Metody laboratoryjne.....	83
Analiza wyników	86
ANALIZA BŁĘDÓW AMPLIFIKACJI	86
NIERÓWNOWAGA SPRZEŻEŃ	87
RÓWNOWAGA HARDY’EGO-WEINBERGA	87
PODSTAWOWE STATYSTYKI	87
ZRÓŻNICOWANIE POPULACJI	88
DYSTANS GENTYCZNY	89
PORÓWNANIE GATUNKÓW	89
TEST NA IZOLACJĘ PRZEZ DYSTANS	90
ANALIZA PRZESTRZENNEJ AUTOKORELACJI.....	90
STRUKTURA POPULACJI — ANALIZA GŁÓWNYCH WSPÓLRZĘDNYCH.....	91
PODZIAŁ POPULACJI NA GRUPY — SAMOVA.....	91
MIGRACJA.....	92
OSZACOWANIE EFEKTU „SZYJKI OD BUTELKI”	92
EFEKTYWNA WIELKOŚĆ POPULACJI	93
SPOKREWNENIE	94
WYNIKI	95

ANALIZA BŁĘDÓW AMPLIFIKACJI.....	95
NIERÓWNOWAGA SPRZĘŻEN.....	96
RÓWNOWAGA HARDY'EGO-WEINBERGA.....	97
RÓWNOWAGA HARDY'EGO-WEINBERGA PO POPRAWKACH DLA ALLELI ZEROWYCH.....	97
RÓWNOWAGA HARDY'EGO-WEINBERGA Z HIPOTEZĄ ALTERNATYWNA O DEFICYCIE LUB NADMIARZE HETEROZYGOT.....	97
PODSTAWOWE STATYSTYKI.....	98
ZRÓŻNICOWANIE POPULACJI.....	103
DYSTANS GENETYCZNY.....	104
PORÓWNANIE GATUNKÓW.....	108
TEST NA IZOLACJĘ PRZEZ DYSTANS.....	110
STRUKTURA POPULACJI — ANALIZA GŁÓWNYCH WSPÓLRZĘDNYCH.....	113
PODZIAŁ POPULACJI NA GRUPY — SAMOVA.....	114
ANALIZA PRZESTRZENNEJ AUTOKORELACJI.....	116
MIGRACJA.....	118
OSZACOWANIE EFEKTU „SZYJKI OD BUTELKI”.....	121
EFEKTYWNA WIELKOŚĆ POPULACJI.....	123
SPOKREWNENIE.....	125
DYSKUSJA.....	127
OCENA MARKERÓW — ALLELE ZEROWE ORAZ NIERÓWNOWAGA SPRZĘŻEN.....	127
RÓWNOWAGA HARDY'EGO-WEINBERGA.....	130
PODSTAWOWE STATYSTYKI.....	132
ZRÓŻNICOWANIE FREKWENCJI ALLELI I DYSTANS GENETYCZNY — PORÓWNANIE GATUNKÓW.....	134
MIGRACJE.....	137
STRUKTURA POPULACJI.....	142
EFEKTYWNA WIELKOŚĆ POPULACJI.....	145
WNIOSKI.....	151
LITERATURA.....	153
ZAŁĄCZNIK I „Spis stwierdzonych haplotypów”.....	165

Przedmowa

Niniejsza praca składa się z dwóch części: (1) „Porównanie budowy czaszki *Pipistrellus pipistrellus* i *Pipistrellus pygmaeus* z zastosowaniem metod trójwymiarowej morfometrii geometrycznej”; (2) „Analiza zróżnicowania genetycznego populacji *Pipistrellus pipistrellus* i *Pipistrellus pygmaeus* w Polsce”. W pierwszej z tych części przeprowadzono analizę zróżnicowania budowy czaszek, pod kątem adaptacji do różnej diety, u dwóch kryptycznych gatunków nietoperzy: karlika małego, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) i karlika drobnego, *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1885). W części drugiej analizie poddano zróżnicowanie genetyczne obu gatunków karlików oraz genetyczną strukturę ich populacji. Każdą z dwóch części pracy przeprowadzono na innym materiale — w części morfologicznej posłużono się materiałem pochodzącym z Wielkiej Brytanii, w części genetycznej materiał zebrano w Polsce.

Porównanie budowy czaszki
Pipistrellus pipistrellus* i *Pipistrellus pygmaeus
z zastosowaniem metod trójwymiarowej
morfometrii geometrycznej

Streszczenie

Celem projektu była analiza budowy różnic w budowie czaszek dwóch kryptycznych gatunków nietoperzy: karlika malutkiego, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774), i karlika drobnego, *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1825); oraz stworzenie procedury matematycznej pozwalającej na badanie metodami trójwymiarowej morfometrii geometrycznej uszkodzonych czaszek (czyli z brakującymi punktami homologicznymi). Badania przeprowadzono na podstawie 14 czaszek karlika malutkiego i 15 karlika drobnego, pochodzących z Wielkiej Brytanii. Czaszki analizowano na podstawie pomiarów współrzędnych (x, y, z) punktów homologicznych (ang. *landmarks*), zmierzonych za pomocą trójwymiarowego mikroskopu refleksyjnego.

Zebrano dane dotyczące położenia odpowiednio 23 oraz 26 punktów na grzbietowej i brzusznej stronie czaszki, 49 punktów na górnej szczęce oraz 34 punktów na lewej połowie żuchwy. Dla większości części badanych czaszek, porównywanych z podziałem na płęć, karlik malutki był większy od karlika drobnego, a największa różnica dotyczyła wielkości żuchwy. Podobnie, międzygatunkowe różnice w kształcie czaszek, analizowanych na podstawie analizy czynników głównych oraz analizy dyskryminacyjnej punktów po zastosowaniu tzw. nałożenia Prokrusta, były najbardziej widoczne w budowie żuchwy, co znajduje odniesienie w różnicach diety badanych gatunków. Przykładowo wyższe i bardziej pionowe kły karlika malutkiego ułatwiają przekłuwanie twardszych ofiar, a większe trzonowce ich rozdrabnianie. Obserwowane u karlika malutkiego relatywnie skrócone ciało żuchwy prawdopodobnie odpowiada za większą siłę zgryzu, przypuszczalnie podobne znaczenie funkcjonalne ma bardziej wyniesiony u tego gatunku wyrostek skroniowy. Zarówno kształt, jak i wielkość żuchwy okazały się dobrymi czynnikami umożliwiającymi rozróżnienie między dwoma kryptycznymi gatunkami nietoperzy. Stworzona procedura, pozwalająca na ekstrapolację brakujących punktów pomiarowych, wydaje się być obarczona niewielkim błędem i umożliwia przeprowadzanie analiz dla źle zachowanego materiału kostnego, co może znaleźć szersze zastosowanie praktyczne, nie tylko w badaniach nad nietoperzami.

Wprowadzenie

Przez ponad 200 lat karlik malutki, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774), i karlik drobny, *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1885), uznawane były za jeden gatunek *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) (ICZN 2003). Jednakże na początku lat 80. ubiegłego stulecia Ahlén (1981) zaobserwował skandynawską formę karlika, emitującą sygnały echolokacyjne na nieco wyższych częstotliwościach niż dotychczas znane sygnały karlika malutkiego. Maksimum sygnału echolokacyjnego tej formy fonicznej gatunku (tzw. ehotypu) przypadało na 55 kHz, podczas gdy dotychczas za maksimum sygnału karlika malutkiego przyjmowano 45 kHz. Następnie takie formy karlików odkryto w Szwajcarii, Hiszpanii i Grecji (Weid i von Helversen 1987, Zingg 1990), a Zingg (1990) jako pierwszy opisał sympatryczne występowanie obu ehotypów. Początkowo uważano, że karlik malutki dostosowuje częstotliwość emitowanych sygnałów do zmiennych warunków środowiska. Jednak w 1993 roku Jones i van Parijs (1993) zaobserwowali, że kolonie macierzyste karlików w Wielkiej Brytanii składały się zawsze tylko z jednej formy fonicznej gatunku i że częstotliwość sygnałów echolokacyjnych nietoperzy z poszczególnych kolonii nie ulegała zmianie, co skłoniło ich do sformułowania przypuszczenia o istnieniu gatunków kryptycznych. Przypuszczenie o izolacji rozrodczej obu ehotypów uprawdopodobniły późniejsze badania Park i in. (1996), w których autorzy ci stwierdzili występowanie tylko jednej formy w badanych grupach rozrodczych (haremach). Dostatecznego dowodu na istnienie kryptycznych gatunków karlika dostarczyły badania nad zróżnicowaniem mitochondrialnego DNA ehotypów, w których wykazano ponad 10-krotnie większe zróżnicowanie sekwencji cytochromu *b* pomiędzy formami fonicznymi niż w ich obrębie (Barratt i in. 1997). Znaczące zróżnicowanie genetyczne obu form potwierdzone zostało następnie w badaniach fragmentu jądrowego DNA ehotypów (Bryja i in. 2009, Mayer i von Helversen 2001, Racey i in. 2007). Ehotypowi z maksimum sygnału echolokacyjnego przypadającego na 45 kHz została nadana nazwa *Pipistrellus pipistrellus sensu stricto* (karlik malutki, ang. *common pipistrelle*), a ehotypowi o maksimum 55 kHz *Pipistrellus pygmaeus* (karlik drobny, ang. *soprano pipistrelle* — ICZN (2003), Jones i Barratt (1999).

W związku z przypuszczeniem o istnieniu dwóch kryptycznych gatunków w obrębie jednego z pospolitszych euplearktycznych gatunków nietoperzy nastąpił wzrost zainteresowania badaczy karlikiem i powstało wiele prac koncentrujących się na znalezieniu różnic pomiędzy ehotypami/gatunkami i wyjaśnieniu możliwych przyczyn specjacji. Opisane zostały różnice w ich wyglądzie zewnętrznym (Häussler i in. 2000), sygnałach echolokacyjnych i sygnałach socjalnych (Barlow i Jones 1997; Papadatou i in. 2008), a także w wielkości kolonii macierzystych (Barlow i Jones 1999), sposobie żerowania (Bartonička i in. 2007, Davidson-Watts i Jones 2006) oraz preferencjach środowiskowych i diecie (Barlow 1997, Nicholls i Racey 2006, Vaughan i in. 1997).

Okazało się, że karlik drobny żeruje przede wszystkim w środowiskach związanych z wodą (nad jeziorami, rzekami), podczas gdy karlik malutki wykorzystuje znacznie bardziej zróżnicowane środowiska: poza tymi związanymi z wodą, również pastwiska i lasy (Vaughan i in. 1997). W skład diety obu gatunków wchodzi przede wszystkim małe muchówki z rzędu Diptera, podrzędu Nematocera. W diecie karlika malutkiego znaczniejszy udział mają jednak owady z rodzin muchówek o większych rozmiarach ciała. W licznych badaniach, dotyczących owadożernych gatunków nietoperzy, wykazano, że gatunki odżywiające się większymi ofiarami mają większe głowy i aparaty zębowe oraz szersze rozwarście szczęki (Fenton 1988, Freeman 1979). Wydaje się, że jest tak również w przypadku karlików malutkiego i drobnego. Barlow i in. (1997) stwierdzili, że wielkość czaszki (jej maksymalna długość), jak i aparatu zębowego (wyrażona długością żuchwy i długością szeregu zębowego żuchwy) są większe u karlika malutkiego niż u karlika drobnego. Stwierdzili także, że chociaż maksymalny kąt rozwarcia szczęki nie różni się u obu gatunków, to dłuższa żuchwa karlika malutkiego sprawia, że w rzeczywistości odległość między szczęką a żuchwą przy ich maksymalnym rozwarciu jest większa. Ponadto wykazali, że górne kły karlika malutkiego są dłuższe niż u karlika drobnego. Uwzględniając wyniki Barlow (1997), wskazujące na większy udział stosunkowo twardszych i większych ofiar w diecie karlika malutkiego w porównaniu z karlikiem drobnym (Diptera nie należące do Nematocera), autorzy ci doszli do wniosku, że karlik malutki zdolny jest do chwytania większych i rozdrabniania twardszych ofiar.

Celem niniejszej pracy było porównanie metodami trójwymiarowej morfometrii geometrycznej budowy czaszek obu kryptycznych gatunków, ze szczególnym uwzględnieniem budowy szczęki i żuchwy (ponad 50 homologicznych punktów

charakterystycznych opisujących aparat zębowy) oraz analiza wykazanych różnic pod kątem adaptacji do zróżnicowanych diet badanych nietoperzy. Ponadto, celem pracy było stworzenie procedury matematycznej umożliwiającej estymację współrzędnych punktów homologicznych, których ze względu na uszkodzenie czaszek nie dało się zmierzyć na wszystkich okazach. Punkty takie zazwyczaj są usuwane z analizy, co niejednokrotnie znacznie obniża wartość poznawczą badań; przykładowo bardzo często nie można określić różnic w budowie kruchych łuków jarzmowych. Problem ograniczonej liczby punktów homologicznych, wspólnych dla badanej grupy, jest szczególnie dotkliwy w przypadku badań nietoperzy, jako że są to zwierzęta zazwyczaj o niedużych rozmiarach i filigranowych czaszkach, a i sposób uzyskiwania materiału — ze względu na ścisłą ochronę gatunkową materiał uzyskuje się z reguły jedynie od przypadkowo znalezionych martwych zwierząt — sprawia, że dostępne okazy są zazwyczaj w znaczącym stopniu uszkodzone.

Morfometria geometryczna jest metodą opartą na pomiarach współrzędnych punktów homologicznych (ang. *landmark*) na obiekcie. Ma ona istotne zalety w porównaniu z tradycyjnymi metodami morfometrycznymi (np. Adams i in. 2004). Umożliwia oddzielenie wielkości od kształtu obiektu oraz wizualizację różnic kształtu i przypisanie tych różnic do konkretnych regionów organizmu (np. Marcus i in. 1996, O'Higgins 2000, Swiderski i in. 2000, Zelditch 2004). Ponadto metoda ta pozwala na zachowanie trójwymiarowych własności obiektu, czyli zapobiega utracie części informacji o kształcie, która przy zastosowaniu tradycyjnych „odległościowych” metod pomiarowych jest nieunikniona.

Pomimo, że Barlow i in. (1997) wykazali różnice w morfologii kryptycznych gatunków, okazało się, że nie są one wystarczające by za ich pomocą skutecznie rozróżnić badane gatunki karlików. Analiza dyskryminacyjna siedmiu pomiarów czaszek nie przyporządkowała do właściwego gatunku 12% z badanych przez nich nietoperzy. Dlatego też postanowiono sprawdzić, czy dzięki zastosowaniu metod morfometrii geometrycznej (zapewniającej m. in. pełniejszy opis kształtu) możliwe będzie rozróżnienie gatunków, czy może też kłopoty z ich identyfikacją są nieuniknionym rezultatem nakładających się cech badanych nietoperzy.

Materiał i metody

Pomiary

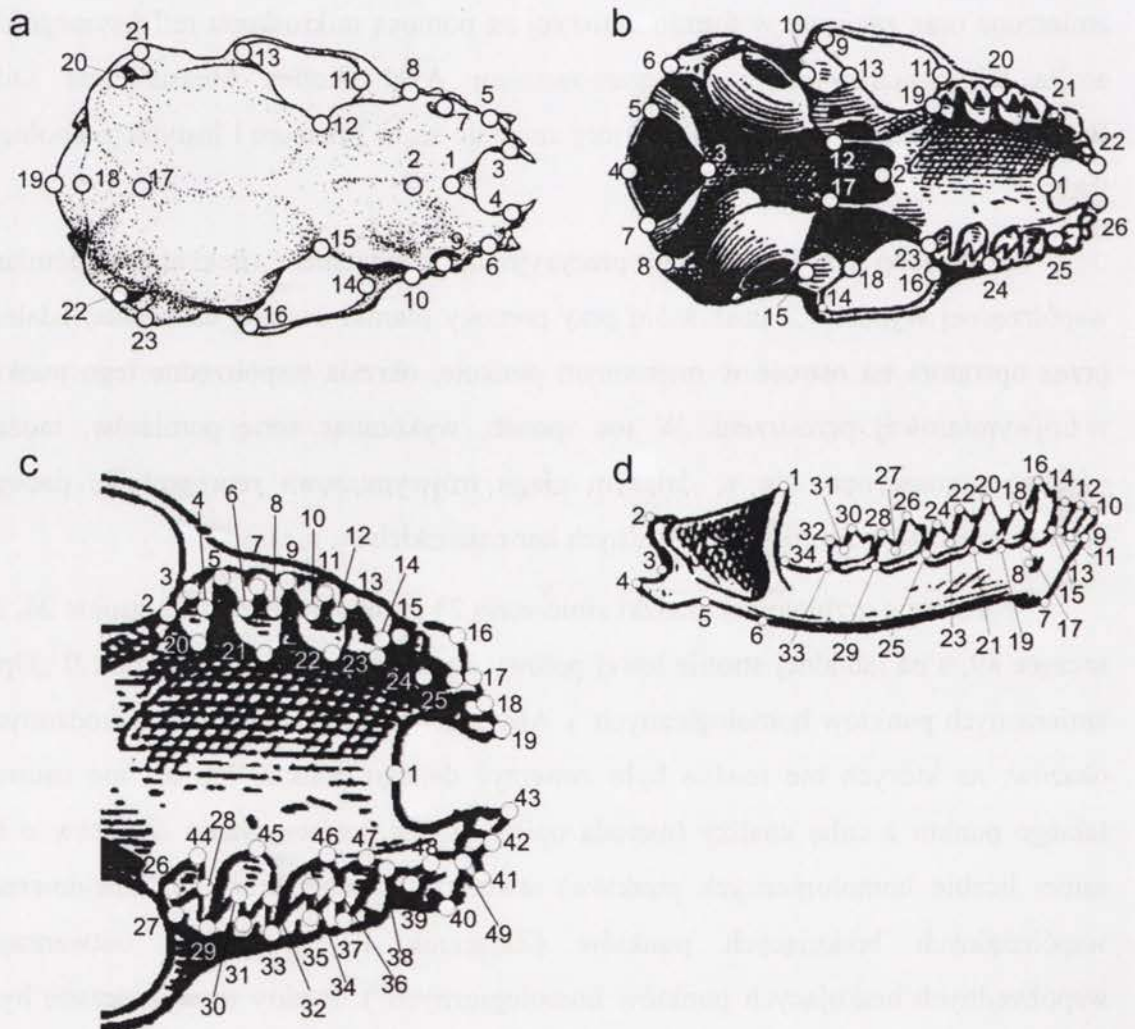
Zmierzono 29 czaszek — w tym 14 (11 samców i 3 samice) karlika malutkiego oraz 15 (5 samców i 10 samic) karlika drobnego. Czaszki pochodziły z Wielkiej Brytanii, a ich przynależność gatunkowa została wcześniej ustalona na podstawie analizy fragmentu cytochromu *b* mitochondrialnego DNA (szczegóły identyfikacji: patrz Barlow i in. 1997; Załącznik I „Spis zmierzonych okazów”). Współrzędne (x, y, z) charakterystycznych i homologicznych punktów na czaszkach zostały zmierzone oraz zapisane w formie cyfrowej za pomocą mikroskopu refleksyjnego do analiz trójwymiarowych z oprogramowaniem Axel (Reflex Measurement Ltd., Butleigh, Somerset BA6 8SP, UK), który znajduje się w Muzeum i Instytucie Zoologii PAN.

Mikroskop ten jest bardzo precyzyjnym urządzeniem (dokładność pomiaru współrzędnej wynosi $0,2 \mu\text{m}$), które przy pomocy plamki światła, ustawianej zdalnie przez operatora na ostrość w mierzonym punkcie, określa współrzędne tego punktu w trójwymiarowej przestrzeni. W ten sposób, wykonując serię pomiarów, można uzyskać uproszczoną, ale w dalszym ciągu trójwymiarową reprezentację danego obiektu zapisaną w formie współrzędnych kartezjańskich (x, y, z).

Na stronie grzbietowej czaszki zmierzono 23 punkty, na brzusznej stronie 26, na szczęcie 49, a na labialnej stronie lewej połowy żuchwy 34 (Ryc.1; Załącznik II „Opis zmierzonych punktów homologicznych”). Aby nie wykluczać z analizy uszkodzonych okazów, na których nie można było zmierzyć danego punktu, lub też nie usuwać takiego punktu z całej analizy (metoda opiera się na porównywaniu obiektów o tej samej liczbie homologicznych punktów) stworzona została procedura znajdowania współrzędnych brakujących punktów (Załącznik III „Procedura odtwarzania współrzędnych brakujących punktów homologicznych”). Punkty te wyznaczone były na podstawie współrzędnych zbioru czaszek tego samego gatunku i płci. Z powodu braku możliwości zastosowania tej procedury we wszystkich przypadkach (np. brak danego punktu w wielu czaszkach, czy też zbyt wiele brakujących punktów w jednym okazie), a także z powodu innych błędów (np. przy pomiarach i dalszej obróbce

danych) niektóre części czaszek badanych okazów zostały usunięte z dalszych analiz; i tak strona grzbietowa i brzuszna oraz szczęka były analizowane na podstawie 27 okazów, a zuchwa na podstawie 26 lewych połówek.

Ocena błędów pomiarowych przeprowadzona została na podstawie zbioru pięciu losowo wybranych czaszek, którym 10-krotnie zmierzono wszystkie punkty homologiczne (w przypadku strony brzusznej czaszki oraz szczęki mierzona była tylko jedna połowa czaszki). Pomiar ten pozwolił również na ocenę trudności w identyfikowaniu konkretnych punktów.



Rycina 1. Punkty homologiczne na grzbietowej (a) i brzusznej (b) stronie czaszki, górnej szczęce (c) i labialnej stronie zuchwy (d).

Morfometria geometryczna — analiza

Do analizy i wizualizacji zmierzonych współrzędnych zastosowano program MorphoJ (Klingenberg 2008) oraz, w przypadku wykresu dla błędu pomiarowego, Morphologika (O'Higgins i Jones 1998). Zmienność morfologiczną czaszek mierzono po rozbiciu na składową wielkości i kształtu. Wielkość szacowano na podstawie wielkości centroidalnej (ang. *centroid size*), czyli pierwiastka kwadratowego z sumy kwadratów odległości między poszczególnymi punktami a środkiem ciężkości obiektu. Ze względu na teoretycznie spodziewany rozkład log-normalny (Watała 2002) za zmienną do oceny różnic wielkości przyjęto logarytm naturalny z wielkości centroidalnej. Należy jednak podkreślić, że na podstawie oceny rozkładu wielkości centroidalnej nie można było odrzucić ani hipotezy o rozkładzie normalnym, ani hipotezy o rozkładzie log-normalnym. Do oceny istotności statystycznej różnic między średnimi wielkościami danej grupy nietoperzy zastosowano test ANOVA dla układów czynnikowych (StatSoft, Inc. 2005) — po uprzednim sprawdzeniu założenia o rozkładzie normalnym zmiennej za pomocą testu Shapiro-Wilka oraz założenia o jednorodności wariancji z zastosowaniem testu Levene'a. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi grupami oceniono na podstawie testu post-hoc NIR (najmniejszej istotnej różnicy).

Do analizy zmienności kształtu zastosowano tzw. nałożenie Prokrusta (ang. *Procrustes analysis*) — analizowane czaszki zostały na siebie nałożone w sposób optymalny, tj. tak, aby odległość między reprezentującymi je punktami w wielowymiarowej przestrzeni kształtu (ang. *shape space*) była jak najmniejsza (jednocześnie przeskalowano je do tych samych rozmiarów). Tak zmodyfikowane współrzędne, tzw. współrzędne Prokrusta, poddano analizie czynników głównych (ang. *principal component analysis*) oraz analizie dyskryminacyjnej (ang. *discriminant function analysis*). W przypadku symetrycznych części czaszki, czyli jej strony grzbietowej i brzusznej oraz szczęki, zmienność kształtu została podzielona na składową symetryczną oraz asymetryczną (tzn. wynikającą z różnic pomiędzy lewą a prawą stroną badanej struktury — Klingenberg 2008), i tylko składową symetryczną poddano obu analizom. Przy analizie dyskryminacji przeprowadzono ocenę wiarygodności klasyfikacji z zastosowaniem walidacji krzyżowej (ang. *leave-one-out cross validation*), jak również test permutacji (1000 iteracji) oceny istotności dla

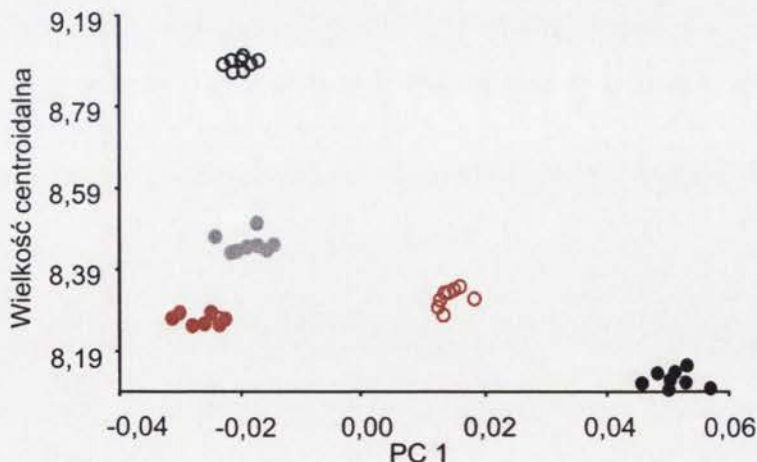
odległości Mahalanobisa i Prokrusta między średnimi kształtami dla danych grup. Dodatkowo, aby ocenić, czy procedura odnajdowania brakujących punktów, oparta przecież na średniej z danej grupy, nie miała wpływu na obniżenie zróżnicowania wewnątrzgrupowego, a tym samym na wyniki analizy dyskryminacji (opartej na porównaniu wariacji wewnątrz- i międzygrupowej), przeprowadzono porównanie wyników analizy dyskryminacyjnej dla grupy żuchw z odtworzonymi punktami z wynikami analizy dyskryminacyjnej dla grupy żuchw wyłącznie ze zmierzonymi punktami (w sumie takich „wspólnych” punktów, dających się zmierzyć u wszystkich okazów, było 30).

Zmienność kształtu dla analizy czynników głównych, jak i analizy dyskryminacji została zobrazowana w formie danej konfiguracji punktów połączonych liniami prostymi (ang. *wireframe graphs*). Pliki (SGV) zawierające wizualizację różnic kształtu dla poszczególnych analiz oraz wykresy z programu MorphoJ (Klingenberg 2008) poddano obróbce graficznej w programie Corel Draw 11. Ze względu na ograniczoną możliwość zaprezentowania wszystkich otrzymanych graficznych wyników w pracy przedstawiono jedynie wyniki analizy dyskryminacyjnej, ponieważ stanowi ona najlepsze podsumowanie różnic między gatunkami. Przedstawione graficznie różnice zaprezentowano w skali oryginalnej oraz po ich pięciokrotnym powiększeniu (powiększenie to zostało jednak tak dobrane, że skala różnic odpowiada mniej więcej tym uzyskanym przy wizualizacji kształtu odpowiadającego skrajnym wartościom czynników głównych).

Wyniki

Ocena błędu

Wydaje się, że przy wysokiej precyzji zastosowanego mikroskopu refleksyjnego, głównego źródła błędu należy upatrywać w zdolnościach mierzącego — ostrości wzroku i zdolności do identyfikacji punktów. Rzeczywiście, największy błąd (najwyższe odchylenie standardowe) zaobserwowany został w pomiarach trzeciej współrzędnej (z), której pomiar był najbardziej zależny od wzroku (głębokości ostrości punktu światła). W najgorszym przypadku odchylenie standardowe wynosiło 0,14, ale w większości przypadków mieściło się w granicach 0,02–0,07 (brak podanych w tym miejscu jednostek dla wartości odchylenia oraz dalej dla wielkości centroidalnej wynika z tego, że pomiary przeprowadzone zostały w układzie współrzędnych, w którym jednostki nie były mianowane). Punkty różniły się stopniem trudności w identyfikacji, w żadnym jednak przypadku odchylenie standardowe dla mierzonego punktu nie było na tyle duże, by uzasadnione było jego wykluczenie z dalszych analiz. Dla grupy wielokrotnie zmierzonych czaszek przeprowadzona została analiza czynników głównych, a następnie określono ich wielkość centroidalną. Odchylenie standardowe wielkości centroidalnej mieściło się w granicach 0,007–0,05 (w większości przypadków mniej niż 0,02). Natomiast analiza czynników głównych pogrupowała wszystkie wielokrotnie mierzone czaszki w oddzielne skupiska (przykładowo patrz: Ryc. 2).



Rycina 2. Wielkość centroidalna oraz pierwszy czynnik główny (PC 1) dla powtórzonych pomiarów górnej szczęki. W nawiasie podano procent całkowitej zmienności opisywany przez pierwszy czynnik główny. Poszczególne symbole odpowiadają jednej z pięciu zmierzonych 10-krotnie szczęk.

Wpływ odtwarzania brakujących punktów na analizę dyskryminacji

Odtworzenie położenia brakujących punktów na podstawie średniej dla grupy nietoperzy o danej płci i gatunku może wpłynąć na obniżenie wariancji wewnątrzgrupowej, a tym samym na wyniki analizy dyskryminacji (sztucznie polepszyć rezultaty klasyfikacji), jako że analiza ta oparta jest na porównaniu zmienności wewnątrzgrupowej do zmienności międzygrupowej. Postanowiono więc porównać wyniki analizy dyskryminacji dla żuchw z odtworzonymi punktami z wynikami uzyskanymi dla żuchw bez odtworzonych punktów. Wyodrębniono 30 z 34 zmierzonych punktów, które można było odnaleźć na wszystkich okazach. Na podstawie analizy dyskryminacyjnej żuchw bez odtworzonych punktów poprawnie zaklasyfikowano 24 z 26 osobników (krzyżowa walidacja dała takie same wyniki). Odległość Mahalanobisa (D) pomiędzy średnimi kształtami obu gatunków wyniosła 3,183 ($p < 0,0001$), a odległość Prokrusta (d) 0,028 ($p < 0,0001$). Na wyniki analizy dyskryminacyjnej mogły jednak wpłynąć inne czynniki niż utrata zmienności wewnątrzgrupowej, chociażby zmiana liczby analizowanych punktów. Przyjęto zatem, że dla oceny wpływu odtwarzania punktów na wyniki przeprowadzanej analizy najodpowiedniejsze będzie nie tyle porównanie, o ile zmieniły się odległości Prokrusta i Mahalanobisa, ale także jak zmieniły się one względem siebie (odległość Mahalanobisa jest „przeskalowana” względem zmienności wewnątrzgrupowej — Klingenberg i Monteiro 2005). Wzrost odległości Prokrusta w porównaniu z wynikami dla grupy żuchw z odtwarzanymi punktami wyniósł 7%, podczas gdy Mahalanobisa 14% (poziom istotności w porównaniu z poprzednią analizą nie uległ zmianie). Większy wzrost odległości Mahalanobisa niż Prokrusta świadczy o tym, że procedura odnajdywania brakujących punktów nie wpłynęła znacząco na utratę zmienności wewnątrzgrupowej.

Różnice wielkości

Analiza wyników testu ANOVA dla układów czynnikowych wykazała, że w przypadku grzbietowej i brzusznej strony czaszki oraz żuchwy czynnikiem bardziej wpływającym na zróżnicowanie wielkości jest przynależność gatunkowa, natomiast w przypadku górnej szczęki tym czynnikiem (*de facto* jedynym istotnym statystycznie)

jest przynależność do danej płci. Wpływ interakcji obu czynników był nieistotny statystycznie we wszystkich przypadkach (Tab. 1).

Średnia wielkość (wyrażona jako średni logarytm naturalny wielkości centroidalnej) części czaszek porównywanych odrębnie dla płci testem post-hoc okazała się większa u karlika malutkiego niż u karlika drobnego. W przypadku części grzbietowej i brzusznej oraz szczęki różnice te nie przekraczały 1% i były istotne statystycznie tylko dla grzbietowej i brzusznej strony czaszki samic i górnej szczęki samców. Największą różnicę w wielkości zaobserwowano w żuchwie — u samic wynosiła ona 1,4%, a u samców 1,7% ($p < 0,05$ w obu przypadkach).

Tabela 1. Zróznicowanie rozmiaru poszczególnych części czaszki — wpływ przynależności gatunkowej oraz płci (wyniki testu dla układów czynnikowych ANOVA).

Część czaszki	Czynnik	Wartość statystyki F	Wartość p
grzbietowa	Płeć	8,9	0,007
	Gatunek	14,4	0,001
brzuszna	Płeć	8,6	0,006
	Gatunek	15,7	0,001
szczeka	Płeć	7,3	0,013
	Gatunek	1,7	0,204
żuchwa	Płeć	5,3	0,031
	Gatunek	11,0	0,003

Największe różnice w wielkości zaobserwowano pomiędzy samicami karlika malutkiego i samcami karlika drobnego — dorsalna i brzuszna części czaszki samic były średnio większe o 1,4 %, szczeka górna o 1,6 %, a żuchwa o 2,6% (dla wszystkich porównań istotnie statystycznie; $p < 0,03$). Z kolei najmniejsze różnice w wielkości, a właściwie ich brak, zaobserwowano pomiędzy samcami karlika malutkiego a samicami karlika drobnego. Samice karlika drobnego miały nieco większą grzbietową i brzuszną część czaszki (0,1%) oraz górną szczękę (0,6%), ale mniejszą żuchwę (0,5%), jednakże różnice te nie były istotne statystycznie.

Wśród porównywanych części czaszki największe różnice w wielkości centroidalnej dotyczyły żuchwy (od 0,5% do 2,6%). Dla innych części czaszki różnice te wahały się w przedziale 0,2–1,4%. Żuchwa była też jedyną częścią czaszki, w przypadku której samce karlika malutkiego były nieco większe niż samice karlika drobnego, ale nie był to wynik istotny statystycznie.

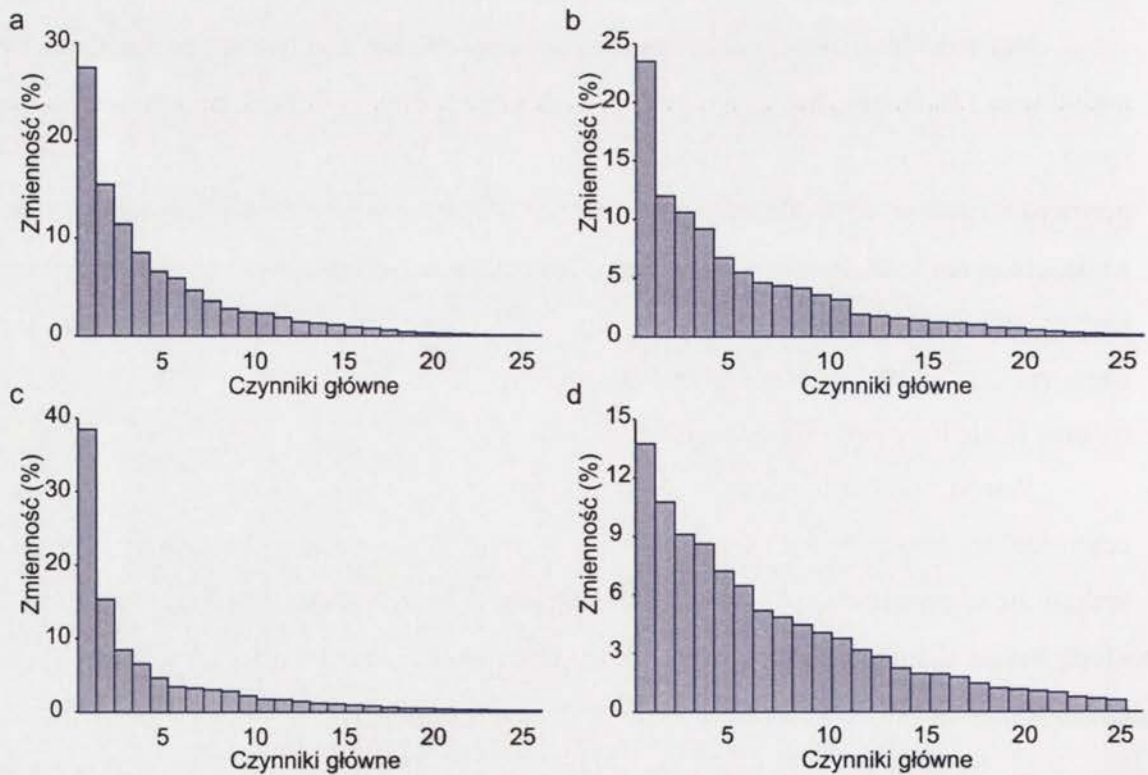
U obu kryptycznych gatunków średnie wielkości wszystkich części czaszki samic były większe niż samców. W przypadku żuchwy karlika malutkiego, różnica między

samcami i samicami, choć stosunkowo bliska przyjętej granicy istotności, nie była jednak istotna ($p = 0,076$). Z kolei w przypadku karlika drobnego tylko część brzuszna czaszki różniła się istotnie statystycznie, a dla żuchwy różnica była bliska granicy istotności ($p = 0,067$). U karlika malutkiego różnice między płciami wynosiły od 0,9% (część grzbietowa) do 1,3% (szczeka i żuchwa), a u karlika drobnego od 0,5% (część brzuszna) do 0,9% (żuchwa).

Różnice kształtu

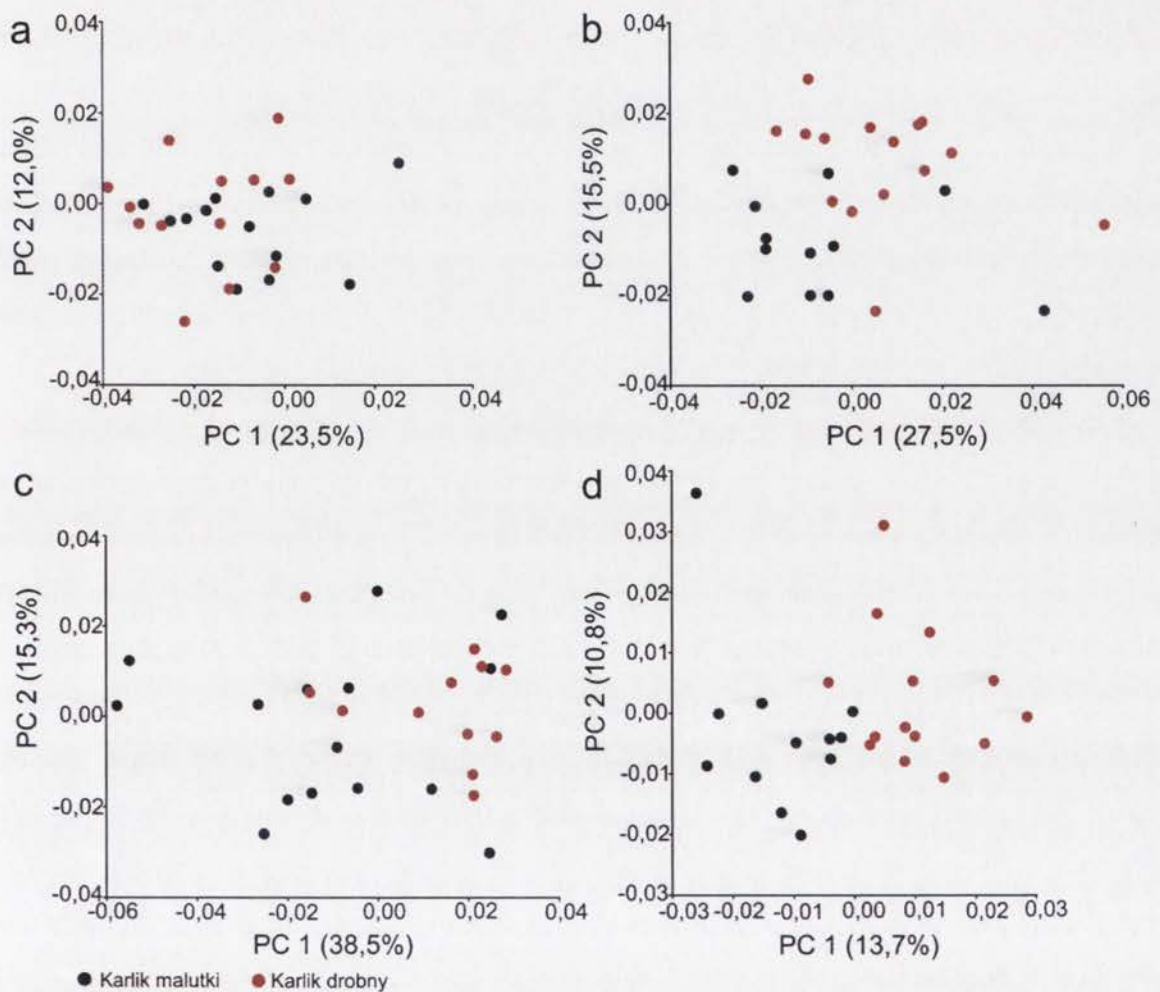
Wyniki analizy dyskryminacyjnej oraz analizy czynników głównych w przypadku porównania osobników danej płci w obrębie jednego gatunku wskazują na to, że nie ma istotnych różnic w kształcie samców i samic. Dlatego też, przy badaniu zmienności kształtu, osobniki obu płci były analizowane wspólnie.

Liczba wyodrębnionych czynników głównych odpowiadających za 99% zmienności kształtu całej badanej próby wynosiła 19 dla grzbietowej części czaszki, 22 dla brzusznej i po 25 dla szczęki górnej i żuchwy (Ryc. 3). Dwa pierwsze czynniki główne odpowiadały kolejno za 27,5% i 15,5% dla grzbietowej części czaszki, 23,5% i 12,0% dla brzusznej, 38,5% i 15,3% dla szczęki górnej oraz 13,7% i 10,8% dla żuchwy.



Rycina 3. Procent zmienności przypisany poszczególnym czynnikom głównym dla grzbietowej (a) i brzusznej (b) części czaszki oraz górnej szczęki (c) i żuchwy (d).

Zmienność kształtu w obrębie danego gatunku była stosunkowo wysoka i żaden z czynników głównych nie pozwolił na całkowite rozdzielenie obu gatunków (Ryc. 4). Podział na odrębne gatunki okazał się najmniej widoczny na wykresie przedstawiającym dwa pierwsze czynniki główne dla brzusznej części czaszki (Ryc. 4a) i nieco bardziej widoczny dla wykresów przedstawiających te same czynniki dla grzbietowej części czaszki i dla górnej szczęki (Ryc. 4b i 4c). Najbardziej wyraźne rozdzielenie badanych gatunków miało miejsce w przypadku rozkładu zmienności kształtu żuchwy (Ryc. 4d).



Rycina 4. Rozkład zmienności kształtu (pierwszy [PC1] i drugi czynnik główny [PC2]) grzbietowej (a) i brzusznej (b) części czaszki oraz szczęki górnej (c) i żuchwy (d) u karlika malutkiego i drobnego. W nawiasach podano procent całkowitej zmienności opisywany przez dany czynnik główny.

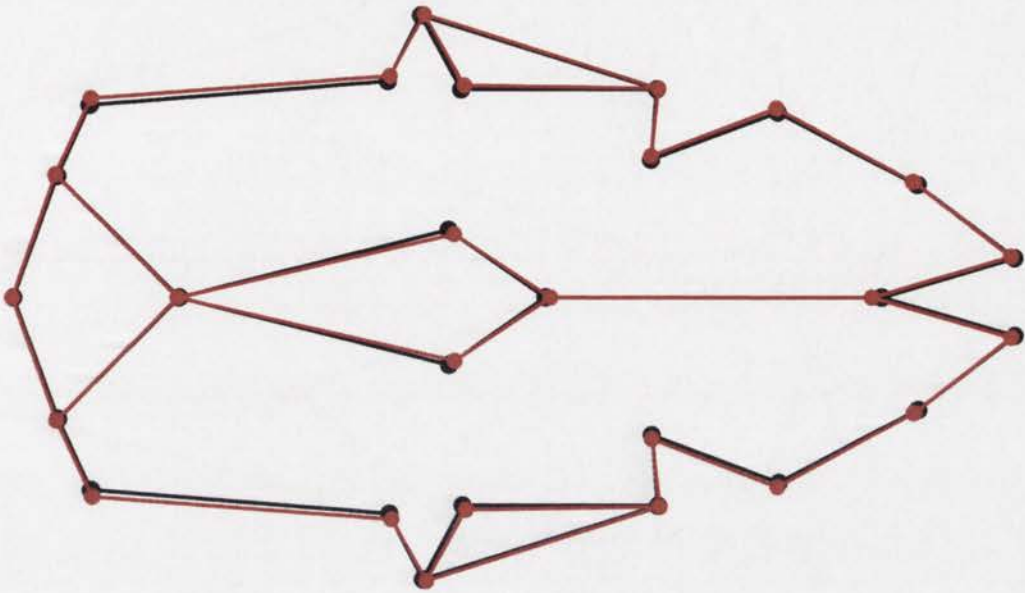
Analiza dyskryminacyjna współrzędnych Prokrusta brzusznej strony czaszki dała podobne wyniki do analizy czynników głównych — odległość Mahalanobisa (D) pomiędzy uśrednionymi kształtami czaszek była nieistotna statystycznie ($D = 2,704$, $p \gg 0,05$)

i chociaż wyniki klasyfikacji według przynależności gatunkowej dla wyznaczonej funkcji dyskryminacyjnej były dobre (tylko 3 z 27 osobników zostały błędnie przypisane), to wyniki walidacji krzyżowej nie wypadły już tak dobrze — 15 nieprawidłowo zaklasyfikowanych osobników, co wskazuje na przeszacowanie wyników analizy dyskryminacyjnej, wynikające z dużej liczby badanych punktów w stosunku do liczby zmierzonych okazów. Tylko odległość Prokrusta (d) pomiędzy uśrednionymi kształtami była istotna statystycznie ($d = 0,015$, $p < 0,05$). Przedstawione powyżej wyniki sugerują, że pod względem kształtu brzusznej części czaszki badane gatunki nie są wyraźnie oddzielone. Niemniej jednak niewielka, ale istotna różnica w odległości Prokrusta oraz widoczne na wykresie czynników głównych przesunięcie karlika malutkiego względem karlika drobnego w stronę dodatnich wartości dla pierwszego czynnika głównego i ujemnych dla drugiego czynnika głównego, pozwalają określić pewne tendencje dla kształtu obu gatunków; i tak u karlika malutkiego widoczna jest tendencja w kierunku wydłużonego rostrum i nieco wydłużonych łuków jarzmowych, natomiast u karlika drobnego widoczne jest poszerzenie puszeki mózgowej (Ryc. 5).

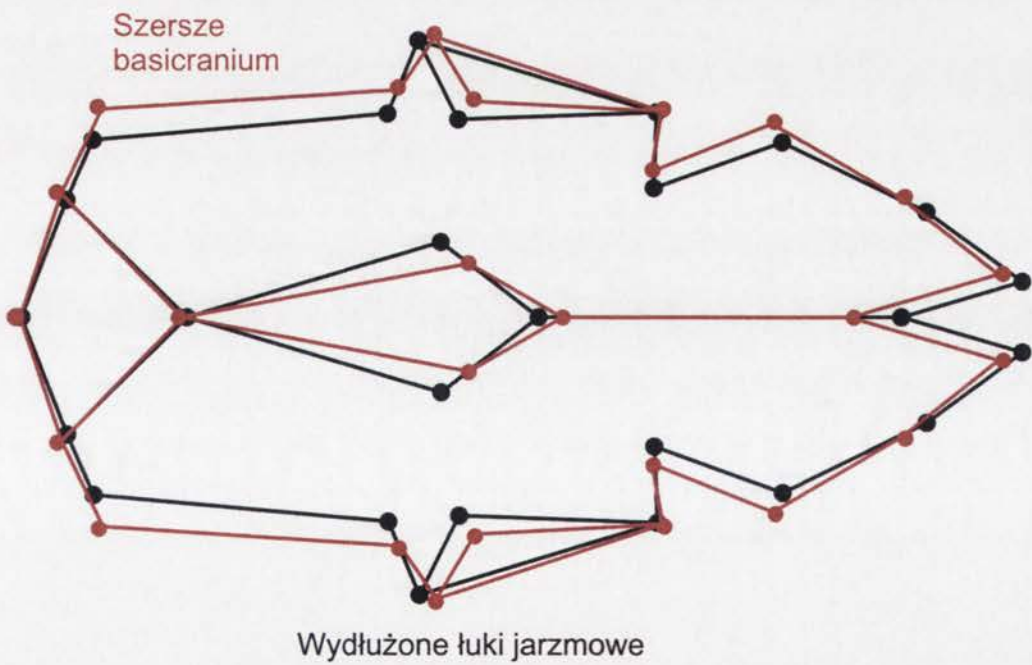
W przypadku grzbietowej części czaszki analiza dyskryminacyjna pozwoliła na poprawne zaklasyfikowanie wszystkich badanych okazów do właściwego gatunku, ale wyniki walidacji krzyżowej dały już gorsze rezultaty — 7 z 27 błędnie zaklasyfikowanych osobników. Zarówno odległość Mahalanobisa, jak i Prokrusta pomiędzy uśrednionymi kształtami była istotna statystycznie i znacznie większa niż w poprzednim przypadku — $D = 6,840$ ($p < 0,05$) oraz $d = 0,027$ ($p < 0,05$). Zaobserwowane różnice w kształcie objawiały się, podobnie jak w przypadku strony brzusznej czaszki, wydłużeniem rostrum i łuków jarzmowych u karlika malutkiego. U karlika drobnego natomiast widoczne było nie tylko poszerzenie puszeki mózgowej, ale również poszerzenie czaszki w rejonie kości czołowej, łuków jarzmowych i kości szczękowej (Ryc. 6). Puszeki mózgowa była także nieco wyższa u tego gatunku (Ryc. 7).

Po analizie dyskryminacyjnej przeprowadzonej dla górnej szczęki wyniki klasyfikacji można uznać za dobre — tylko jeden błędnie przypisany osobnik, ale krzyżowa walidacja dała znacznie gorszy rezultat: aż 11 z 27 błędnie zaklasyfikowanych osobników. Odległość Mahalanobisa wynosiła 2,702 ($p < 0,05$), a Prokrusta 0,027 ($p < 0,01$). Różnice w kształcie szczęki górnej porównywanych gatunków dotyczyły przede wszystkim skrócenia szeregów zębowych i poszerzenia odległości między nimi u karlika drobnego (Ryc. 8), wydłużenia i nieco bardziej pionowego ustawienia górnych kłów (Ryc. 9) oraz niewielkiego poszerzenia pierwszego i drugiego górnego trzonowca u karlika malutkiego (Ryc. 8b).

a

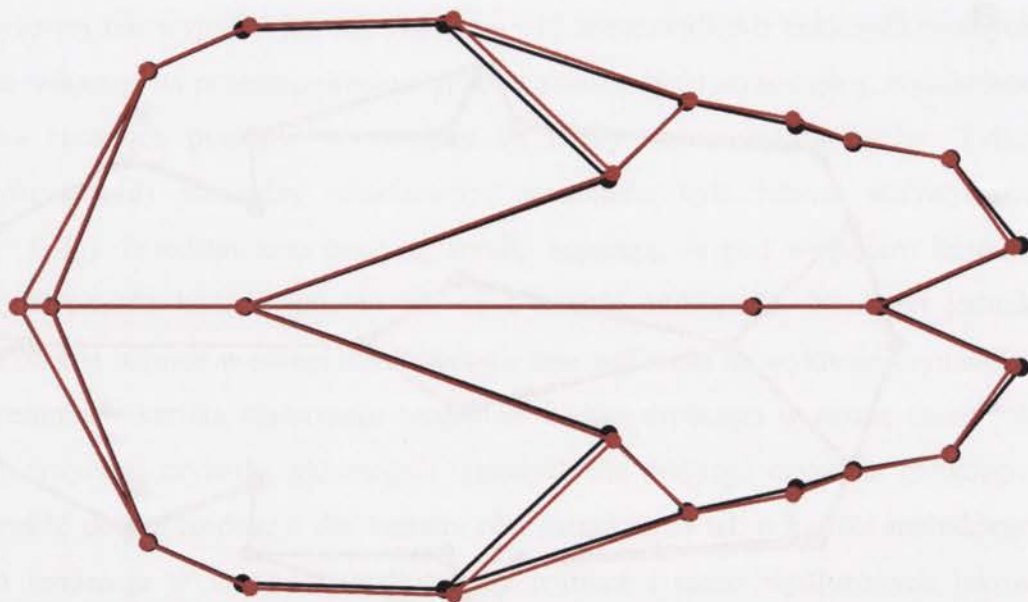


b

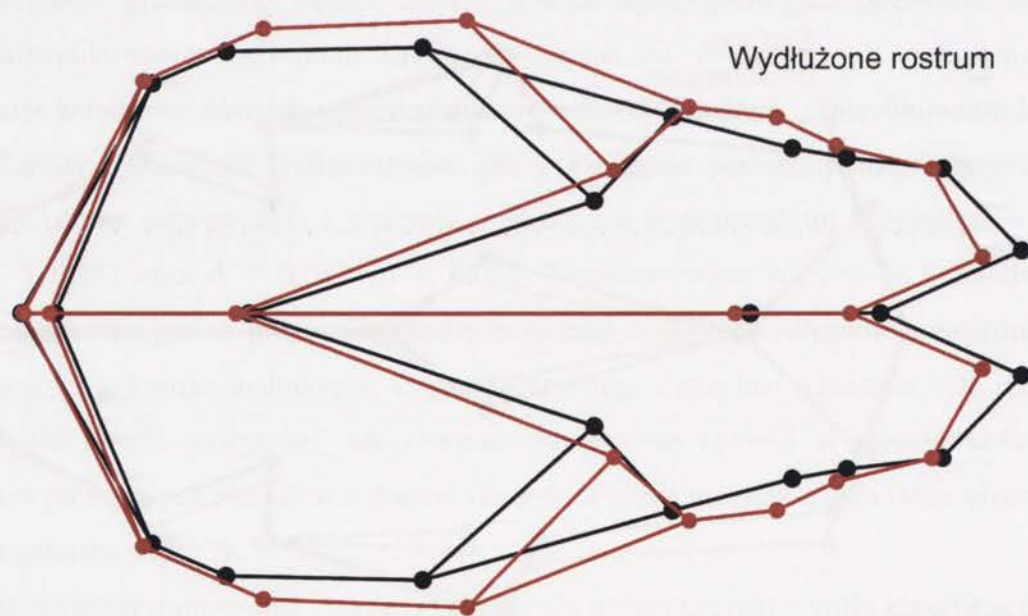


Rycina 5. Porównanie kształtu czaszki karlika malutkiego (kolor czarny) i karlika drobnego (kolor czerwony): część brzuszna (a), część brzuszna po pięciokrotnym powiększeniu różnic (b).

a



b



Szerszy rejon: kości czołowej, łuków jarzmowych,
kości szczękowej

Rycina 6. Porównanie kształtu czaszki karlika małego (kolor czarny) i karlika drobnego (kolor czerwony): część grzbietowa (a), część grzbietowa po pięciokrotnym powiększeniu różnic (b).

a

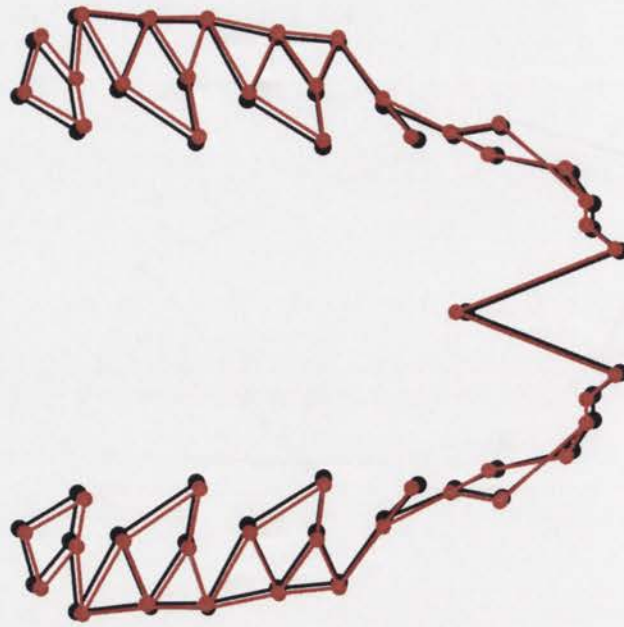


b

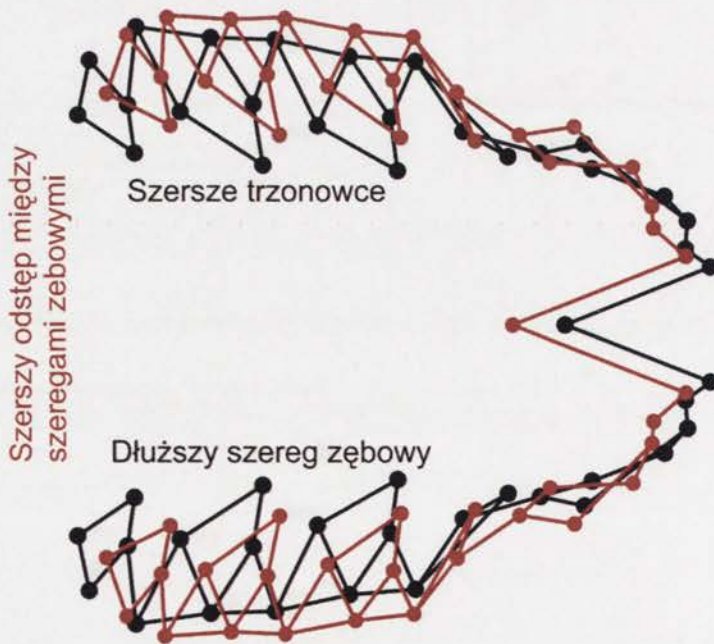


Rycina 7. Porównanie kształtu czaszki karlika malutkiego (kolor czarny) i karlika drobnego (kolor czerwony): widok z boku (a), widok z boku po pięciokrotnym powiększeniu różnic (b).

a

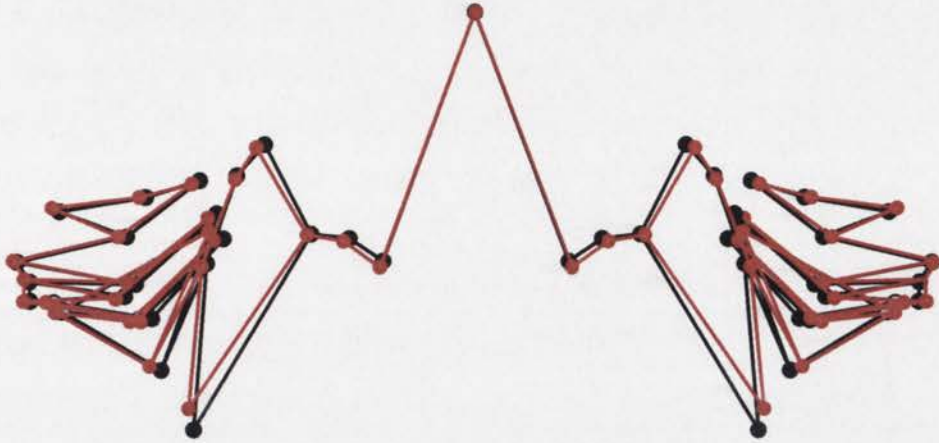


b

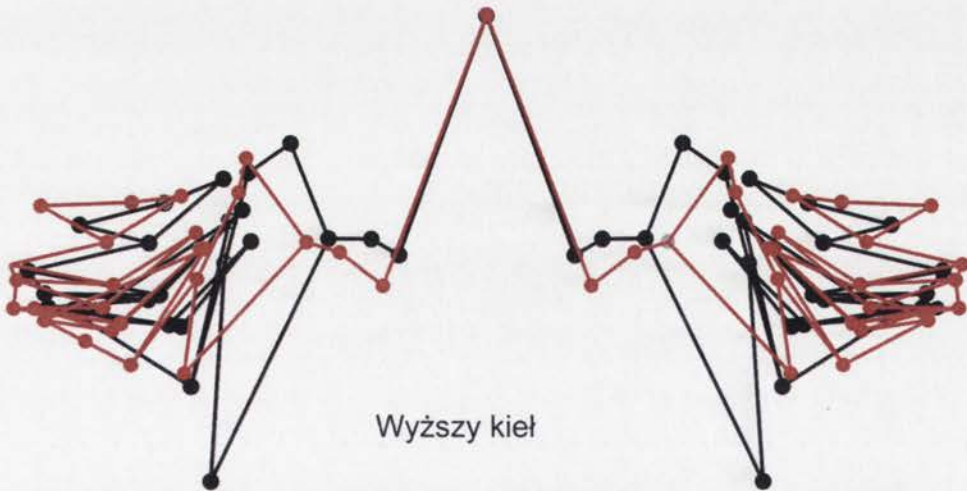


Rycina 8. Porównanie kształtu górnej szczęki karlika malutkiego (kolor czarny) i karlika drobnego (kolor czerwony): widok z góry (a), widok z góry po pięciokrotnym powiększeniu różnic (b).

a



b

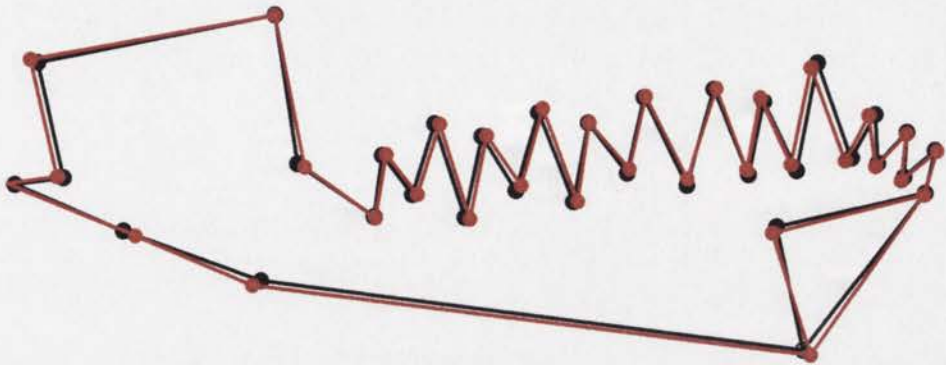


Rycina 9. Porównanie kształtu górnej szczęki karlika malutkiego (kolor czarny) i karlika drobnego (kolor czerwony) widok frontalny (a), widok frontalny po pięciokrotnym powiększeniu różnic (b).

Podobnie jak w przypadku analizy czynników głównych, również w wyniku analizy dyskryminacyjnej najbardziej wyraźny rozdział badanych gatunków widoczny był w przypadku kształtu żuchwy — tylko jeden z 26 osobników został błędnie zaklasyfikowany, natomiast w wyniku krzyżowej walidacji trzy osobniki zostały błędnie przypisane do gatunku, a zarówno odległość Mahalanobisa, jak i Prokrusta ($D = 2,750$ i $d = 0,025$) były wysoce istotne statystycznie ($p < 0.001$ w obu przypadkach).

Różnice w kształcie żuchwy objawiały się w skróceniu ciała żuchwy, ale z relatywnym wydłużeniem szeregów zębowych u karlika malutkiego, oraz z poszerzeniem gałęzi (ramienia) żuchwy, a także ze skróceniem kłów i zmniejszeniem trzonowców u karlika drobnego (Ryc. 10). Ponadto, u karlika malutkiego wyrostek skroniowy był wyżej wysunięty w stosunku do wyrostka stawowego (Ryc. 10b).

a



b



Rycina 10. Porównanie kształtu żuchwy karlika malutkiego (kolor czarny) i karlika drobnego (kolor czerwony): widok labialny (a), widok labialny po pięciokrotnym powiększeniu różnic (b).

Dyskusja

Różnice wielkości

Nie wszystkie wyniki porównań międzygrupowych poszczególnych części czaszek według testu post-hoc NIR osiągnęły założony poziom istotności, niemniej jednak ogólna prawidłowość wydaje się niepodważalna — wszystkie części czaszki samic karlika malutkiego były największe, a te samców karlika drobnego najmniejsze. Z pewnością pewnym ograniczeniem tych badań jest niewielka liczebność próby, a przede wszystkim duża dysproporcja między liczebnością samców i samic w próbach oraz odwrotna proporcja obu płci u każdego z gatunków (przewaga samców u karlika malutkiego, przewaga samic u karlika drobnego). Niemniej jednak badania Cardini i Elton (2007) nad wpływem błędu wynikającego ze sposobu pobierania próby w badaniach morfometrycznych wykazały, że ocena średniego rozmiaru dla populacji na podstawie niedużych liczebności prób daje na ogół poprawne oszacowania, chociaż niezbyt dobre oszacowania dla rozrzutu tej cechy w populacji.

Różnica wielkości pomiędzy badanymi gatunkami jest raczej niewielka, bowiem maksymalnie sięga 2,6%. Dla celów porównawczych otrzymanych wyników z innymi pracami warto tutaj jednak przypomnieć, że w wielu badaniach morfometrycznych autorzy całkowicie pomijają założenie o log-normalnym rozkładzie wielkości. W omawianym przypadku nie można było odrzucić ani założenia o rozkładzie normalnym, ani założenia o rozkładzie log-normalnym. Zdecydowano się na ten drugi rozkład z przyczyn teoretycznych, wynikających z założenia, że w przypadku zmiennej, na którą wpływa duża liczba czynników losowych, które pojawiają się w czasie i wpływają na nią proporcjonalnie do czasu, mamy do czynienia właśnie z takim rozkładem. Wielkość ciała, będąca wynikiem rozciągniętych w czasie procesów wzrostowych, z których na każdy oddziałuje duża liczba niezależnych czynników, spełnia te założenia (Watała 2002). Niemniej jednak, gdyby przyjęto założenie o rozkładzie normalnym badanej cechy, wówczas, jakkolwiek nie wpłynęłoby to na ocenę poziomu istotności testu ANOVA, miałoby wpływ na procentową ocenę różnic (wzrost z 2,6% do 7,3%).

Największa różnica międzygatunkowa w wielkości dotyczyła żuchwy. Otrzymane wyniki były istotne statystycznie dla wszystkich przeprowadzonych porównań z wyjątkiem jednego (samce karlika malutkiego versus samice karlika drobnego). Również w testach ANOVA dla wybranych układów czynnikowych stwierdzono, że żuchwa była tą częścią

czaszki, w przypadku której czynnik przynależności do danej płci był najmniej znaczący. Można więc przyjąć, że wielkość żuchwy w najlepszym stopniu charakteryzuje badane gatunki spośród wszystkich przebadanych cech. Żuchwa jest też jedyną częścią czaszki, dla której różnice w wielkości gatunków są na wyższym poziomie niż między płciami w obrębie badanych gatunków.

W odniesieniu do średnich wielkości centroidalnych badanych części czaszek uzyskane wyniki są zgodne z wynikami, przeprowadzonej tradycyjnymi metodami morfometrycznymi, pracy Barlow i in. (1997), w której autorzy wykazali, że karlik malutki ma dłuższą czaszkę i większy aparat zębowy od karlika drobnego. Wykazali oni również, że długość żuchwy i szeregów zębowych są cechami pozwalającymi na najlepsze rozróżnienie pomiędzy badanymi gatunkami kryptycznymi. To, że największe różnice pomiędzy karlikami stwierdzone zostały właśnie w rozmiarze żuchwy, nie wydaje się zaskakujące w świetle zaobserwowanych różnic w diecie tych nietoperzy — u karlika malutkiego stwierdzono bowiem istotnie wyższy udział ofiar o większych rozmiarach ciała, niż ma to miejsce u karlika drobnego (Barlow 1997), a korelacja między rozmiarem aparatu zębowego a rozmiarem ofiary jest już znana u wielu gatunków nietoperzy owadożernych (Fenton 1988, Freeman 1979, Freeman i Lemen 2007, Lee i McCracken 2004).

Uzyskane wyniki potwierdzają dymorfizm płciowy (w kierunku większych samic) u karlika malutkiego. Natomiast w przypadku karlika drobnego wydaje się on dość prawdopodobny, ale nie można go ani potwierdzić, ani wykluczyć. Pojawia się w części brzusznej czaszki, ale już w grzbietowej części nie jest istotny statystycznie. Podobnie, nie jest istotny w przypadku porównania wielkości szczęki, ale na granicy istotności w przypadku żuchwy. Pośrednio potwierdzają go porównania międzygatunkowe, jako że wszystkie różnice pomiędzy wielkością samic karlika malutkiego a samców karlika drobnego są wysoce istotne, a pomiędzy samicami karlika drobnego a samcami karlika malutkiego takich różnic się nie stwierdza.

W badaniach Barlow i in. (1997) zaobserwowano również różnice między płciami (w maksymalnej długości czaszki, długości szeregów zębowych) u obu gatunków, ale w konkluzji autorzy stwierdzili, że różnice te są zbyt małe, aby można było mówić o dymorfizmie płciowym u badanych karlików (warto tutaj wspomnieć, że autorzy borykali się z podobnym problemem w wielkości i składzie prób jak w niniejszej pracy). Prezentowane badania dają dużo bardziej szczegółowy opis wielkości, jako że wielkość centroidalna jest miarą szacującą cały rozmiar badanego obiektu. Różnice w wielkości między płciami u karlika malutkiego nie są duże (na poziomie 1%), ale obecne. U karlika drobnego różnice te

są nieco mniejsze niż 1%, ale dymorfizm wydaje się prawdopodobny, tym bardziej, że jest on zjawiskiem powszechnym u nietoperzy z rodziny mroczkowatych Vespertilionidae (Campbell i Kitchener 1980, Bornholdt i in. 2008, Burnett 1983, Fujita 1984, Iliopoulou-Georgudaki 1984, Myers 1978, Williams i Findley 1979). Dymorfizm płciowy (na poziomie 6% wielkości) wykazany został też u innego gatunku karlika, *Pipistrellus hesperus* (Allen, 1864), (Findley i Traut 1970).

Zaobserwowany poziom różnic pomiędzy wielkością samic i samców badanych gatunków (0,9%–1,3% u karlika malutkiego oraz 0,5–0,9% u karlika drobnego) jest bardzo podobny do tego stwierdzonego w europejskiej populacji nocka rudego, *Myotis daubentoni* (Kuhl, 1817), u którego różnice w wielkości między płciami zawierały się w przedziale 0,6–1,4% (Bogdanowicz 1992). Hipotezy wyjaśniające przyczyny dymorfizmu płciowego często związane są z różnicami w wymogach termoregulacyjnych osobników obu płci — większą wielkość samic nietoperzy tłumaczy się koniecznością utrzymania odpowiedniej temperatury ciała (uniknięcia hipotermii) dla prawidłowego rozwoju płodu (Findley i Wilson 1982), czy też koniecznością przetrwania okresu hibernacji w kondycji umożliwiającej utrzymanie ciąży (aż do momentu pojawienia się odpowiednich zasobów pokarmowych — Bogdanowicz 1992). Uważa się też, że dobór naturalny może faworyzować większe potomstwo, co z kolei prowadzi do selekcji w kierunku większych matek zdolnych do donoszenia większego płodu (Fujita 1984, Mayers 1978, Ralls 1976). Jeśli wyjaśnienia te są słuszne oznaczałoby to, że dymorfizm płciowy może się zmieniać w obrębie gatunku w zależności od szerokości geograficznej i związanego z nią klimatu. W badaniach nad koloniami nocka rudego z obszaru ich europejskiego zasięgu stwierdzono pozytywną korelację między wielkością czaszki samic tego gatunku a niskimi temperaturami; ponadto stwierdzono dużą zmienność stopnia dymorfizmu płciowego, w tym jeden przypadek odwrócenia jego kierunku (Bogdanowicz 1992). Zależność od szerokości geograficznej dymorfizmu płciowego, a nawet zmianę jego kierunku, zaobserwowano także u indyjskiej populacji owocożernego nietoperza *Cynopterus sphinx* (Vahl, 1797) — samice były większe na południu, a samce na północy badanego obszaru (Storz i in. 2001). Wyniki te wskazują, że przy ocenie dymorfizmu płciowego ważnym czynnikiem może być miejsce pochodzenia prób. W niniejszej pracy wykorzystano próby z Wielkiej Brytanii, którą cechuje stosunkowo łagodny klimat. Przepuszczalnie, badane gatunki z obszarów chłodniejszego klimatu Europy kontynentalnej może cechować inny stopień dymorfizmu płciowego, tym bardziej, że u *Pipistrellus pipistrellus sensu lato* wykazano różnice w wielkości zależne od klimatu (Stebbing 1973).

Różnice w kształcie

We wszystkich częściach czaszki pierwszy czynnik główny odpowiadał za stosunkowo nieduży procent zmienności kształtu (od 11% do 39%), co wskazuje na brak spektakularnych różnic w budowie czaszki kryptycznych gatunków. Mimo to wydaje się, że różnice w budowie żuchwy badanych nietoperzy można uznać za istotne, skoro pozwoliły one na zaklasyfikowanie większości osobników do właściwego gatunku, zarówno na podstawie analizy czynników głównych (metody kładącej większy nacisk na zmienność w obrębie grupy niż analiza dyskryminacyjna), jak i analizy dyskryminacyjnej (Ryc. 4d i 10).

Według wyników krzyżowej walidacji analizy dyskryminacyjnej tylko trzech z 26 (11%) osobników nie można było poprawnie przydzielić do właściwego gatunku na podstawie kształtu żuchwy. Wynik ten, co ciekawe, jest bardzo zbliżony do uzyskanego przez Barlow i in. (1997), gdzie udział źle zaklasyfikowanych osobników po analizie dyskryminacyjnej stanowił 12% (w analizie brano pod uwagę długość kondylobazalną czaszki, długość żuchwy i szeregów zębowych). Warto tutaj jednak zauważyć, że autorzy ci podali jedynie wyniki analizy dyskryminacyjnej bez oceny jej istotności; gdyby zastosowali krzyżową walidację zapewne udział niepoprawnie zaklasyfikowanych osobników byłby znacznie wyższy niż podane 12%. Ponadto przedstawione w niniejszej pracy wyniki analizy dyskryminacyjnej dotyczą samego kształtu żuchwy, podczas gdy w przypadku pracy Barlow i in. (1997), przeprowadzonej metodami tradycyjnymi, czynniki wielkości i kształtu nie są od siebie oddzielone.

W badaniach budowy aparatu zębowego wielu gatunków zwierząt wykazano, że zaobserwowane różnice pozostają w ścisłym związku z dietą, wpływając nie tylko na jego wielkość, ale także i kształt (np. Patterson 1984, Tschapka i in. 2008, Wiens i Rotenberry 1980, Wyckmans i in. 2007, Young i in. 2007). To właśnie badania na nietoperzach często podawane są za przykład udanego zastosowania ekomorfologii (*ang.* ecomorphology), czyli wnioskowania o cechach ekologicznych organizmu na podstawie analizy jego cech morfologicznych (Arita i Fenton 1997; patrz też: Swartz i in. 2003), a kształt szczęki i zębów u nietoperzy można śmiało uznać za odzwierciedlenie ich diety (Neuweiler 2000; patrz też: Freeman 1979, 1981a, 1981b, 1984, 1988, 1992, 1995 i 2000; Freeman i Weins 1997 oraz Tschapka i in. 2008). Ciekawy przegląd takich właśnie badań, w których analizowane były zależności między morfologią a takimi czynnikami, jak sposób żerowania, różnice w sygnałach echolokacyjnych, czy zależności ewolucyjne

stanowią prace Bogdanowicza i in. (1999 i 2005), Storzy i in. (2001), Fentona i Bogdanowicza (2002), Nogueiry i in. (2005), Gannona i Racza (2006), Bornholdta i in. (2008) oraz Evin i in. (2008). Van Cakenberghe i in. (2002) w pracy dotyczącej ewolucyjnych zależności między zmianami w diecie a budową czaszki wykazali u nietoperzy z rodziny liścionosów (Phyllostomatidae) korelację między ewolucyjnymi zmianami w diecie a zmianami w budowie czaszki, a zmiany te były na ogół w zgodzie z wysnutymi *a priori* przypuszczeniami opartymi na wiedzy o funkcjonalnych dostosowaniach do danej diety u innych nietoperzy i gatunków ssaków.

Także w przypadku badanych gatunków różnice w budowie aparatu żębowego stanowią odzwierciedlenie różnic w diecie. Karlik malutki ma względnie dłuższe i bardziej pionowe górne kły (Ryc. 9), nieco większe dolne kły (Ryc. 10) oraz większe pierwsze i drugie górne trzonowce (Ryc. 8) — wszystko to wydaje się przystosowaniem do przekłuwania i rozdrabniania twardszych ofiar, których udział w diecie tego gatunku jest wyższy niż u karlika drobnego. W swojej pracy Barlow (1997) wykazała, że 13% pokarmu karlika malutkiego składa się z owadów nie należących do miękkich Nematocera, podczas gdy u karlika drobnego takie owady stanowią 5%.

Bardziej rozwinięty wyrostek skroniowy u karlika malutkiego (Ryc. 10) może sugerować różnice w wielkości mięśnia skroniowego kryptycznych gatunków, a tym samym większą siłę zgryzu karlika malutkiego. To, że wielkość tego wyrostka przekłada się na wielkość mięśnia, a ta z kolei na siłę zgryzu, wykazane zostało u różnych gatunków ssaków, choć możliwe są też pewne wyjątki od tej reguły (Emerson i Radinsky 1980). Badania porównawcze roślinożerców specjalizujących się w zgryzaniu twardych roślin oraz nie-specjalistów pokazują na wyraźny podział tych grup właśnie na podstawie wysokości wyrostka skroniowego oraz wysokości czaszki, co wiąże się z większą powierzchnią dla przyczepu mięśni (Perez-Barberia i Gordon 1999). Także u nietoperzy znane są przykłady na to, że specjalizacja w spożywaniu twardych ofiar objawia się wyższym wyrostkiem skroniowym oraz większą odległością między wyrostkiem skroniowym a stawowym (Jacobs 1996). W szeregu badań nad nietoperzami z różnych gildii pokarmowych (drapieżnymi, owocożernymi i nektarozernymi) Freeman (1979, 1981a, 1981b, 1995, 2000) wykazała, że nietoperze drapieżne w porównaniu z innymi nietoperzami mają wyższe czaszki i wyrostki skroniowe. Ponadto, zaobserwowana została nie tylko różnica w wielkości wyrostka skroniowego, ale także jego położenia (wyniesienia) w stosunku do wyrostka stawowego. U karlika malutkiego różnica między wysokością tych wyrostków jest większa. Nisko położony wyrostek stawowy w stosunku do skroniowego pozwala na

optymalizację siły zgryzu a rozwarcia szczęki tj. zachowania siły zgryzu przy większym rozwarciu (Turnbull 1970), a większe rozwarcie szczęki tego gatunku zostało już wykazane przez Barlow i in. (1997). Większy wyrostek skroniowy u karlika malutkiego może znaleźć przełożenie w optymalnym kierunku działania mięśnia skroniowego przy większych rozwarciach szczęki (van Cakenberghe i in. 2002). Lepsze zrozumienie różnic między badanymi gatunkami wymagałoby jednak dodatkowych badań, przede wszystkim odnośnie zaczepów mięśniowych szczęki i żuchwy (patrz także: Dumont 2004).

Skrócona żuchwa karlika malutkiego (Ryc. 10), choć z dłuższym szeregiem zębowym niż u karlika drobnego, także wskazuje na silniejszy zgryz tego pierwszego gatunku (Freeman 1979) z jednoczesną większą powierzchnią do rozdrabniania pokarmu. Należy zauważyć, że choć żuchwa jest względnie skrócona, nie oznacza to jednak, że w wartościach bezwzględnych jest ona mniejsza; przeciwnie — zgodnie z uzyskanymi wynikami oraz wynikami badań Barlow i in. (1997) jest ona większa u karlika malutkiego.

Różnice w sile zgryzu i zdolności rozdrabniania pokarmu, związane z wielkością mięśni, mogą być znacznie silniej skorelowane z różnicami w diecie niż same różnice w kształcie szczęki i żuchwy. Przykładowo u pięciu karaibskich gatunków ryb z rodziny Labridae stwierdzono, że nie tyle różnice w budowie szczęki i zębów, ale właśnie wielkość mięśnia gardłowego, była najsilniej związana z udziałem twardszych ofiar w diecie (Clifton i Motta 1998). Czynnikiem limitującym dostępność ofiar może być nie tyle ich wielkość, co właśnie twardość. Na przykład Goldman i Henson (1977) zauważyli, że nietoperz *Pteronotus parnellii* (Grey, 1838) jest zdolny do chwytania chrząszczy, których egzoszkieletów nie jest już jednak w stanie przebić. Szczegółowe badania nad działaniem mięśni szczęk i siłą zgryzu u nietoperzy są jednak bardzo nieliczne (np. De Gueldre i De Vree 1984, 1988 i 1990; Kallen i Gans 1972). Przykładowo siła i kierunek siły zgryzu dla pokarmu o różnej twardości badane były u rudawki wielkiej, *Pteropus giganteus* (Brünnich, 1782), (De Gueldre i De Vree 1990). W badaniach tych wykazano, że siła i kierunek „zgrzania” zależne były od natężenia aktywności mięśnia żwacza i mięśnia skroniowego. Autorzy ci nie osiągnęliby ostatecznych wniosków, co do współdziałania wymienionych mięśni, bez przeprowadzenia niezwykle precyzyjnej analizy sekwencji kurczenia się poszczególnych mięśni i ich budowy anatomicznej — w szczególności miejsc zaczepu mięśni z wyrostkami szczęki i żuchwy (De Gueldre i De Vree 1988).

Wydłużone rostrum karlika malutkiego (Ryc. 5, 6 i 7), zaobserwowane także przez Häusslera i in. (2000) w zewnętrznym wyglądzie, wydaje się konsekwencją dłuższych

szeregów zębowych. Nie znaleziono żadnej funkcjonalnego wytłumaczenia dla nieco szerszego rostrum karlika drobnego (Ryc. 6). Względnie szersza i wyższa puszką mózgową karlika drobnego przy mniejszej wielkości tego gatunku (Ryc. 7) może być związana z koniecznością zwiększenia powierzchni dla przyczepów mięśni szczęki.

Wnioski

Zastosowanie metod trójwymiarowej morfometrii geometrycznej w badaniu kryptycznych gatunków nietoperzy umożliwiło uzyskanie dodatkowych, bardzo szczegółowych informacji o różnicach, zarówno w budowie czaszki, jak i jej wielkości, między karlikiem malutkim a karlikiem drobnym. Czynnikiem najbardziej różniącym się na poziomie gatunkowym okazały się kształt i wielkość żuchwy; według wyników krzyżowej walidacji analizy dyskryminacyjnej tylko trzy z 26 (11%) osobników zostały niepoprawnie przydzielone do właściwego gatunku na podstawie kształtu żuchwy. Stwierdzono istotne różnice w budowie wyrostka skroniowego, jak i w długości ciała żuchwy oraz w uzębieniu obu gatunków karlików, które wskazują na dietę jako czynnik wpływający na ich różnicowanie. Niewykluczone, że drobne różnice w diecie legły u podstaw procesu specjacji tych taksonów (porównaj: Nogueira i in. 2005). Oczywiście, pytanie, jak wpłynęły na ten proces inne czynniki ekologiczne i behawioralne — np. użytkowane środowisko czy różnice w eholokacji — pozostaje otwarte.

Pomimo wyszukanego aparatu analitycznego nie znaleziono jednak cechy pozwalającej na pełne rozróżnienie kryptycznych gatunków karlików, co wydaje się być nieuniknionym rezultatem nakładających się cech tych nietoperzy. Różnice w wielkości badanych gatunków maskowane są także przez dymorfizm płciowy w kierunku większych samic — został on stwierdzony u karlika malutkiego, a uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że występuje także i u karlika drobnego.

Jak się okazało, zaprezentowana w pracy procedura odtwarzania brakujących punktów homologicznych na podstawie średniej z grupy nie zaburzyła wyników analizy dyskryminacyjnej, a pozwoliła na zachowanie pełniejszej charakterystyki badanych kształtów, niż miałyby to miejsce w przypadku wykluczenia tych punktów z przeprowadzonych analiz. Procedura ta może znaleźć zastosowanie w badaniach uszkodzonego materiału kostnego.

Literatura

Adams D. C., Rohlf F. J., Slice D. E. (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the "revolution". *Italian Journal of Zoology* **71**: 5–16.

Ahlén I. (1981) Identification of Scandinavian bats by their sounds. Swedish University of Agricultural Sciences, *Rapport* **6**: 1–56.

Arita H. T. i Fenton M. B. (1997) Flight and echolocation in the ecology and evolution of bats. *TREE* **12**: 53–58.

Barlow K. E. (1997) The diets of two phonic types of the bat *Pipistrellus pipistrellus* in Britain. *Journal of Zoology, London* **243**: 597–609.

Barlow K. E. i Jones G. (1997) Differences in songflight calls and social calls between two phonic types of the vespertilionid bat *Pipistrellus pipistrellus*. *Journal of Zoology, London* **241**: 315–324.

Barlow K. E. i Jones G. (1999) Roosts, echolocation calls and wing morphology of two phonic types of the *Pipistrellus pipistrellus*. *Zeitschrift für Säugetierkunde* **64**: 257–268.

Barlow K. E., Jones G., Barratt E. M. (1997) Can skull morphology be used to predict ecological relationships between bat species? A test using two cryptic species of pipistrelle. *Proceedings of Royal Society, London B* **264**: 1695–1700.

Barratt E. M., Deaville R., Burland T. M., Bruford M. W., Jones G., Racey P. A., Wayne R. K. (1997) DNA answers the call of pipistrelle bat species. *Nature* **97**: 138–139.

Bartonička T., Řehák Z., Gaisler J. (2007) Can pipistrelles, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) and *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1825), foraging in a group, change parameters of their signals? *Journal of Zoology, London* **272**: 194–201.

Bogdanowicz W. (1992) Sexual dimorphism in size of the skull in European *Myotis daubentoni* (Mammalia: Chiroptera), w: Horáček I., Vohralík V. (red.) Prague studies in mammalogy. Charles University Press, Praha: 17–25.

Bogdanowicz W., Fenton M.B., Daleszczyk K. (1999) The relationships between echolocation calls, morphology and diet in insectivorous bats. *Journal of Zoology, London* **247**: 381–393.

Bogdanowicz W., Juste J., Owen R. D., Sztencel A. K. (2005) Geometric morphometrics and cladistics: testing evolutionary relationships in mega- and microbats. *Acta Chiropterologica* **7**: 39–49.

Bornholdt R., Oliveira L.R., Fabian M. E. (2008) Size and shape variability in the skull of *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) (Chiroptera: Vespertilionidae) from two geographic areas in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **68**: 623–631.

Bryja J., Kaňuch P., Fornuskova A., Bartonička T., Řehák Z. (2009) Low population genetic structuring of two cryptic bat species suggests their migratory behaviour in continental Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **96**: 103–114.

Burnett C. D. (1983) Geographic and secondary sexual variation in the morphology of *Eptesicus fuscus*. *Annals of Carnegie Museum* **52**: 139–162.

Campbell N. A. i Kitchener D. J. (1980) Morphological divergence in the genus *Eptesicus* (Microchiroptera: Vespertilionidae) in Western Australia: a multivariate approach. *Australian Journal of Zoology* **28**: 457–474.

Cardini A. i Elton S. (2007) Sample size and sampling error in geometric morphometric studies of size and shape. *Zoomorphology* **126**: 121–134.

Clifton K. B. i Motta P. J. (1998). Feeding morphology, diet, and ecomorphological relationships among five Caribbean labrids (Teleostei, Labridae). *Copeia* **4**: 953–966.

Davidson-Watts I. i Jones G. (2006) Differences in foraging behaviour between *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) and *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1825). *Journal of Zoology, London* **268**: 55–62.

De Gueldre G. i De Vree F. (1984) Movements of the mandibles and tongue during mastication and swallowing in *Pteropus giganteus* (Megachiroptera). A cineradiographical study. *Journal of Morphology* **179**: 95–114.

De Gueldre G. i De Vree F. (1988) Quantitative electromyography of the masticatory muscles of *Pteropus giganteus* (Megachiroptera). *Journal of Morphology* **196**: 73–106.

De Gueldre G. i De Vree F. (1990). Biomechanics of the masticatory apparatus of *Pteropus giganteus* (Megachiroptera). *Journal of Zoology, London* **220**: 311–332.

Dumont E. R. (2004) Patterns of diversity in cranial shape among plant-visiting bats. *Acta Chiropterologica* **6**: 59–74.

Emerson S. B. i Radinsky L. (1980) Functional analysis of sabertooth cranial morphology. *Paleobiology* **6**: 295–312.

Evin A., Baylac M., Ruedi M., Mucedda M., Pons J. M. (2008) Taxonomy, skull diversity and evolution in a species complex of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae): a geometric morphometric appraisal. *Biological Journal of Linnean Society* **95**: 529–538.

Fenton M. B. (1988) Head size and the foraging behaviour of animal-eating bats. *Canadian Journal of Zoology* **67**: 2029–2035.

Fenton M. B. i Bogdanowicz W. (2002) Relationships between external morphology and foraging behaviour: bats in the genus *Myotis*. *Canadian Journal of Zoology* **80**: 1004–1013.

Findley J. S. i Traut G. L. (1970) Geographic variation in *Pipistrellus hesperus*. *Journal of Mammalogy* **51**: 741–765.

Findley J. S. i Wilson, D. E. (1982) Ecological significance of chiropteran morphology, w: Kunz, T. H. (red.) Ecology of bats. Plenum Press, New York: 243–260.

Freeman P. W. (1979) Specialized insectivory: beetle-eating and moth-eating molossid bats. *Journal of Mammals* **60**: 467–479.

Freeman P. W. (1981a) A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. *Fieldiana: Zoology* **7**: 1–173.

Freeman P. W. (1981b) Correspondence of food habits and morphology in insectivorous bats. *Journal of Mammalogy* **62**: 166–173.

Freeman P. W. (1984) Functional cranial analysis of large animalivorous bats (Microchiroptera). *Biological Journal of Linnean Society* **21**: 387–408.

Freeman P. W. (1988) Frugivorous and animalivorous bats (Microchiroptera): dental and cranial adaptations. *Biological Journal of Linnean Society* **33**: 249–272.

Freeman P. W. (1992) Canine teeth of bats (Microchiroptera): Size, shape, and role in crack propagation. *Biological Journal of the Linnean Society* **45**: 97–115.

Freeman P. W. (1995) Nectarivorous feeding mechanisms in bats. *Biological Journal of the Linnean Society* **56**: 439–463.

Freeman P. W. (2000). Macroevolution in microchiroptera: recoupling morphology and ecology with phylogeny. *Evolutionary Ecology Research* **2**: 317–335.

Freeman P. W. i Lemen C. A. (2007) Using scissors to quantify hardness of insects: do bats select for size or hardness? *Journal of Zoology, London* **271**: 469–476.

Freeman P. W. i Weins W. N. (1997) Puncturing ability of bat canine teeth: the tip, w: Yates T. L., Gannon W. L., Wilson D. E. (red.) Life Among the Muses: Papers in Honor of James S. Findley. Museum of Southwestern Biology, University of New Mexico, Albuquerque: 225–232.

Fujita M. (1984) Geographic variation and sexual dimorphism in *Myotis lucifugus*: do bigger babies make bigger mothers? *Bat Research News* **25**: 41.

Gannon W. L. i Racz G. R. (2006) Character displacement and ecomorphological analysis of two long-eared *Myotis* (*M. auriculus* and *M. evotis*). *Journal of Mammalogy* **87**: 171–179.

Goldman L. J. i Henson O. W., Jr. (1977) Prey recognition and selection by the constant-frequency bat, *Pteronotus p. parnellii*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **2**: 411–419.

Häussler U., Nagel A., Braun M., Arnold A. (2000) External characters discriminating sibling species of European pipistrelles, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) and *P. pygmaeus* (Leach, 1825). *Myotis* **37**: 27–40.

ICZN (2003) Opinion 2028 (Case3073). *Vespertillio pipistrellus* Schreber, 1774 and *V. pygmaeus* Leach, 1825 (currently *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*; Mammalia, Chiroptera): neotypes designated. *The Bulletin of Zoological Nomenclature* **60**: 85–87.

Iliopoulou-Georgudaki J. G. (1984) Intraspecific and intrapopulation morphologic variation in the sharp-eared bat, *Myotis blythii* (Tomes, 1857) (Chiroptera: Vespertilionidae), from Greece. *Bonner zoologische Beiträge* **15**: 15–24.

Jacobs D. S. (1996) Morphological divergence in an insular bat, *Lasiurus cinereus semotus*. *Functional Ecology* **10**: 622–630.

Jones G. i Barratt E. M. (1999) *Vespertilio pipistrellus* Schreber, 1774 and *V. pygmaeus* Leach, 1825 (currently *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*; Mammalia, Chiroptera): proposed designation of neotypes. *The Bulletin of Zoological Nomenclature* **56**: 182–186.

Jones G. i van Parijs S. M. (1993) Bimodal echolocation in pipistrelle bats: are cryptic species present? *Proceedings of Biological Sciences* **251**: 119–125.

Kallen F. C. i Gans C. (1972) Mastication in the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *Journal of Morphology* **136**: 385–420.

Klingenberg C. P. (2008) MorphoJ. Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK. http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm

Klingenberg C. P. i Monteiro L. R. (2005) Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology* **54**: 678–688.

Lee Y. F. i McCracken G. F. (2004) Flight activity and food habits of three species of *Myotis* bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in sympatry. *Zoological Studies* **43**: 589–597.

Marcus L. F., Corti M., Loy A., Naylor G. J. P., Slice D. E. (1996) Advances in morphometrics. Plenum Press, New York, 620 s.

Mayer F. i von Helversen O. (2001) Sympatric distribution of cryptic bat species across Europe. *Biological Journal of Linnean Society* **74**: 365–374.

Mayers P. (1978) Sexual dimorphism in size of vespertilionid bats. *American Naturalist* **112**: 701–711.

Neuweiler G. (2000) The biology of bats. Oxford University Press, New York, 320 s.

Nicholls B. i Racey P. A. (2006) Habitat selection as a mechanism of resource partitioning in two cryptic bat species *Pipistrellus pipistrellus* and *Pipistrellus pygmaeus*. *Ecography* **29**: 697–708.

Nogueira M. R., Monteiro L. R., Peracchi A. L., de Araújo A. F. B. (2005) Ecomorphological analysis of the masticatory apparatus in the seed-eating bats, genus *Chiroderma* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Journal of Zoology, London* **266**: 355–364.

O'Higgins P. (2000) The study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry. *Journal of Anatomy* **197**: 103–120.

O'Higgins P. i Jones N. (1998) Morphologika software. University College, London. www.york.ac.uk/res/fme/resources/software.htm.

Patterson B. D. (1984) Correlation between mandibular morphology and specific diet of some desert grassland acrididae (Orthoptera). *American Midland Naturalist* **111**: 296–303.

Park K. J., Altringham J. D., Jones G. (1996) Assortative roosting in the two phonic types of *Pipistrellus pipistrellus* during the mating season. *Proceedings of Royal Society, London B* **263**: 1495–1499.

Papadatou E., Butlin R. K., Altringham J. D. (2008) Identification of bat species in Greece from their echolocation calls. *Acta Chiropterologica* **10**: 127–143.

Perez-Barberia F. J. i Gordon I. J. (1999) The functional relationship between feeding type and jaw and cranial morphology in ungulates. *Oecologia* **118**: 157–165.

Racey P. A., Barratt E. M., Burland T. M., Deaville R., Gotelli D., Jones G., Piertney S. B. (2007) Microsatellite DNA polymorphism confirms reproductive isolation and reveals differences in population genetic structure of cryptic pipistrelle bat species. *Biological Journal of Linnean Society* **90**: 539–550.

Ralls K. (1976) Mammals in which females are larger than males. *The Quarterly Review of Biology* **51**: 245–276.

Rohlf F. J. (2000) NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.11T. Exeter Software, Setauket.

StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.

Stebbins R. E. (1973) Size clines in the bat *Pipistrellus pipistrellus* related to climatic factors. *Periodicum Biologorum* **75**: 189–194.

Storz J. F., Balasingh J., Bhat H. R., Thiruchenthil P. N., Swami Doss D. P., Prakash A. A., Kunz T. H. (2001) Clinal variation in body size and sexual dimorphism in an Indian fruit bat, *Cynopterus sphinx* (Chiroptera: Pteropodidae). *Biological Journal of Linnean Society* **72**: 17–31.

Swartz S. M., Freeman P. W., Stockwell E. F. (2003) Ecomorphology of bats: comparative and experimental approaches relating structural design to ecology, w: T. H. Kunz , M. B. Fenton (red.) *Bat ecology*. The University of Chicago Press, Chicago: 257–300.

Swiderski D. L., Zelditch M. L., Fink W. L. (2000). Phylogenetic analysis of skull shape evolution in marmotine squirrels using landmarks and thin-splines. *Hystrix* **11**: 49–75.

Tschapka M., Sperr E. B., Caballero-Martínez L. A., Medellín R. A. (2008) Diet and cranial morphology of *Musonycteris harrisoni*, a highly-specialized nectar feeding bat in western Mexico. *Journal of Mammalogy* **89**: 924–932.

Turnbull W. D. (1970) Mammalian masticatory apparatus. *Fieldiana: Geology* **18**: 149–356.

van Cakenberghe V., Herrel A., Aguirre L.F. (2002) Evolutionary relationships between cranial shape and diet in bats (Mammalia: Chiroptera), w: Aerts P., Herrel A., D'Aout K., Van Damme R. (red.) Topics in functional and ecological vertebrate morphology. Shaker, Maastricht: 205–236.

Vaughan N., Jones G., Harris S. (1997) Habitat use by bats (Chiroptera) assessed by means of a broad-brand acoustic method. *Journal of Applied Ecology* **34**: 716–730.

Watała C. (2002) Biostatystyka — wykorzystanie metod statystycznych w pracy badawczej w naukach biomedycznych. α -medica Press, Bielsko Biała, 423 s.

Weid R. i von Helversen O. (1987) Ortungsrufe europäischer Fledermäuse beim Jagdflug im Freiland. *Myotis* **25**: 5–27.

Wiens J. A. i Rotenberry J. T. (1980) Patterns of morphology and ecology in grassland and shrubsteppe bird populations. *Ecological Monographs* **50**: 287–308.

Williams D. F. i Findley J. S. (1979) Sexual size dimorphism in vespertilionid bats. *The American Midland Naturalist* **102**: 113–126.

Wyckmans M., van Wassenbergh S., Adriaens D., van Damme R., Herrel A. (2007) Size-related changes in cranial morphology affect diet in the catfish *Clari allabes longicauda*. *Biological Journal of the Linnean Society* **92**: 323–334.

Young R. L., Haselkorn T. S., Badyaev A. V. (2007). Functional equivalence of morphologies enables morphological and ecological diversity. *Evolution* **61**: 2480–2492.

Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets H. D., Fink W. L. (2004) Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press, New York, 443 s.

Zingg P. (1990) Akustische Artidentifikation von Fledermäusen (Mammalia: Chiroptera) in der Schweiz. *Revue Suisse de Zoologie* **97**: 263–294.

Załącznik I

Spis zmierzonych okazów

*Pipistrellus pygmaeus**

622 (F), 662 (F), 671 (F), 672 (F), 675 (F), 677 (F), 689 (F), 691 (F), 692 (F), 706 (F),
680 (M), 718 (M), 730 (M), 731 (M), 734 (M).

*Pipistrellus pipistrellus**

57 (M), 597 (M), 598 (M), 607 (M), 620 (M), 621 (M), 624 (M), 650 (M), 657 (M),
660 (M), 729 (M), 623 (F), 711 (F), 738 (F).

* numer okazu, F — samica, M — samiec

Załącznik II

Opis zmierzonych punktów homologicznych

STRONA GRZBIETOWA CZASZKI

1. punkt początkowy szwu międzynosowego
2. najwyższy punkt na szwie czołowym
- 3., 4. najbardziej wysunięty punkt na zewnętrznej krawędzi kości przysiecznej
- 5., 6. punkt na bocznej krawędzi kości szczękowej przy tylnej krawędzi kła górnego
- 7., 9. środek dolnej krawędzi otworu podoczodołowego
- 8., 10. wcięcie nad wyrostkiem łzowym
- 11., 14. najbardziej wysunięty do przodu punkt wewnętrznej krawędzi łuku jarzmowego
- 12., 15. najbardziej wcięty punkt na zwężeniu międzyoczodołowym
- 13., 16. najbardziej wysunięty do tyłu punkt wewnętrznej krawędzi łuku jarzmowego
17. środkowy punkt na szwie międzyciemieniowym
18. najbardziej wysunięty do tyłu punkt na szwie nadpotylicznym
19. najbardziej zewnętrzny punkt części nadpotylicznej
- 20., 22. najbardziej wysunięty do tyłu punkt na wewnętrznej krawędzi zewnętrznego przewodu słuchowego
- 21., 23. środek dolnej krawędzi zewnętrznego przewodu słuchowego

STRONA BRZUSZNA CZASZKI

1. punkt środkowy na krawędzi otworu nosowego
2. tylna krawędź wyrostka podniebiennego
3. najbardziej wysunięty do przodu punkt na krawędzi otworu wielkiego
4. najbardziej wysunięty do tyłu punkt na krawędzi otworu wielkiego
- 5., 7. najbardziej bocznie wysunięty punkt na krawędzi otworu wielkiego
- 6., 8. wierzchołek wyrostka sutkowego
- 9., 14. najbardziej wysunięty do tyłu punkt wewnętrznej krawędzi łuku jarzmowego
- 10., 15. najbardziej wysunięty do tyłu punkt zewnętrznej części łuku jarzmowego
- 11., 16. najbardziej wysunięty do przodu punkt na wewnętrznej krawędzi łuku jarzmowego
- 12., 17. wierzchołek haczyka skrzydłowego

- 13., 18. punkt ekstremum na bocznej wewnętrznej krawędzi łuku jarzmowego
- 19., 23. metastyl M^3
- 20., 24. guzek na I^1
- 21., 25. wierzchołek P^2
- 22., 26. parastyl M^2

SZCZĘKA

- 1. punkt środkowy na krawędzi otworu nosowego
- 2., 26. metastyl M^3
- 3., 27. mesostyl M^3
- 4., 28. środek mezialnej krawędzi M^3
- 5., 29. parastyl M^3
- 6., 30. środek dystalnej krawędzi M^2
- 7., 31. mesostyl M^2
- 8., 32. środek mezialnej krawędzi M^2
- 9., 33. parastyl M^2
- 10., 34. środek dystalnej krawędzi M^1
- 11., 35. mesostyl M^1
- 12., 36. parastyl M^1
- 13., 37. najbardziej dystalny punkt na krawędzi P^4
- 14., 38. najbardziej mezialny punkt na krawędzi P^4
- 15., 39. wierzchołek P^2
- 16., 40. wierzchołek C
- 17., 41. główny guzek I^2
- 18., 42. dodatkowy guzek I^1
- 19., 43. główny guzek I^1
- 20., 44. najbardziej wysunięty w stronę podniebienną punkt na koronie M^3
- 21., 45. najbardziej wysunięty w stronę podniebienną punkt na koronie M^2
- 22., 46. najbardziej wysunięty w stronę podniebienną punkt na koronie M^1
- 23., 47. najbardziej wysunięty w stronę podniebienną punkt na koronie P^4
- 24., 48. najbardziej wysunięty w stronę podniebienną punkt na koronie C
- 25., 49. dodatkowy guzek I^1

ŻUCHWA

1. wierzchołek wyrostka skroniowego
2. wierzchołek wyrostka stawowego
3. punkt maksymalnego zagłębienia wcięcia esowatego
4. wierzchołek wyrostka kąтового
5. punkt maksymalnego zagłębienia wcięcia pod wyrostkiem kątowym
6. punkt maksymalnego wygięcia na wysokości gałęzi żuchwy na dolnej krawędzi ciała żuchwy
7. najbardziej wysunięty do przodu punkt na dolnej krawędzi ciała żuchwy
8. środek krawędzi otworu bródkowego
9. najbardziej wysunięty do przodu punkt ciała żuchwy
10. wierzchołek I_1 (na środku krawędzi zęba)
11. punkt środkowy między zębodołami I_1 i I_2
12. wierzchołek I_2 (na środku krawędzi zęba)
13. punkt środkowy między zębodołami I_2 i I_3
14. wierzchołek I_3 (na środku krawędzi zęba)
15. punkt środkowy między zębodołami I_3 i C
16. wierzchołek C
17. punkt środkowy między zębodołami C i P_1
18. wierzchołek P_1
19. punkt środkowy między zębodołami P_1 i P_4
20. wierzchołek P_4
21. punkt środkowy między zębodołami P_4 i M_1
22. protoconid M_1
23. punkt środkowy w zagłębieniu między guzkami M_1
24. hypoconid M_1
25. punkt środkowy między zębodołami M_1 i M_2
26. protoconid M_2
27. punkt środkowy w zagłębieniu między guzkami M_2
28. hypoconid M_2
29. punkt środkowy pomiędzy między zębodołami M_2 i M_3
30. protoconid M_3
31. punkt środkowy w zagłębieniu między guzkami M_3

32. hypoconid M₃
33. koniec szeregu zębowego
34. punkt na styku ciała i ramienia żuchwy

Załącznik III

Procedura odtwarzania współrzędnych brakujących punktów homologicznych

Każda czaszkę można przedstawić jako zbiór punktów: $(x_1, y_1, z_1), \dots, (x_n, y_n, z_n)$. Środek ciężkości czaszki $(\bar{x}, \bar{y}, \bar{z})$ ma następujące współrzędne:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + \dots + x_n}{n}, \bar{y} = \frac{y_1 + \dots + y_n}{n}, \bar{z} = \frac{z_1 + \dots + z_n}{n}.$$

Innymi słowy, używając terminologii rachunku prawdopodobieństwa, każda z czaszek może być uznana za trójwymiarową zmienną losową (X, Y, Z) . Wtedy środkiem ciężkości czaszki jest punkt (EX, EY, EZ) .

A zmienna losowa ma macierz kowariancji:

$$\begin{bmatrix} D^2 X & \text{cov}(X, Y) & \text{cov}(X, Z) \\ \text{cov}(Y, X) & D^2 Y & \text{cov}(Y, Z) \\ \text{cov}(Z, X) & \text{cov}(Z, Y) & D^2 Z \end{bmatrix},$$

która, przy założeniu, że $EX = EY = EZ = 0$ (a można przyjąć takie założenie, bo współrzędne czaszek były centrowane), redukuje się do formy:

$$Q = \begin{bmatrix} EX^2 & EXY & EXZ \\ EXY & EY^2 & EYZ \\ EXZ & EYZ & EZ^2 \end{bmatrix}.$$

Gdzie:

$$EX^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$EXY = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \text{ etc.}$$

Ta macierz kowariancji jest symetryczna i dodatnio określona, co oznacza, że ma rzeczywiste wektory własne. Wektory te są prostopadłe (ortogonalne) i można je wykorzystać do wyznaczenia tzw. „naturalnego” układu współrzędnych każdej czaszki — po znormalizowaniu długości stają się one wektorami podstawowymi nowego układu współrzędnych.

Procedura składała się z następujących kroków:

1. Brakujący punkt był zastępowany przez średnią arytmetyczną tego punktu w zbiorze czaszek (tego samego gatunku i płci).

2. Każda czaszka była normalizowana: przesuwana tak, by środek ciężkości miał współrzędne $(0,0,0)$, a następnie jej wielkość centroidalna przeskalowana do 1.*
3. Dla każdej z czaszek znajdowano wektory własne (v_1, v_2, v_3) macierzy kowariancji. Następnie czaszka była obracana do czasu, gdy wektory podstawowe starego układu współrzędnych (e_1, e_2, e_3) przyjmowały wartość (v_1, v_2, v_3) **.
4. Brakujący punkt (punkty) był zastępowany przez średnią arytmetyczną tego punktu w zbiorze czaszek (tego samego gatunku i płci).
5. Poprzednia operacja mogła wpłynąć na zmianę środka ciężkości, wielkości centroidalnej i kierunku osi układu współrzędnych kroki 2–4 były powtarzane, dopóki współrzędne brakującego punktu nie ulegały zmianie z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku.

Procedura została przeprowadzona w programie Excel z wyjątkiem obliczania wektorów własnych, do czego zastosowano NTSYSpc 2.1 (Rolf 2000).

*Normalizacja

W mechanice moment bezwładności I układu punktów $(x_1, y_1, z_1), \dots, (x_n, y_n, z_n)$ o masie $\frac{1}{n}$ obliczony w odniesieniu do punktu (a, b, c) wyraża się wzorem:

$$I = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [(x_i - a)^2 + (y_i - b)^2 + (z_i - c)^2].$$

W tym przypadku szukamy momentu bezwładności w odniesieniu do środka ciężkości, który wynosi $(0,0,0)$, więc:

$$I = EX^2 + EY^2 + EZ^2 = \text{tr}Q.$$

Kiedy współrzędne czaszki zostają podzielone przez wielkość centroidalną \sqrt{I} nowy moment bezwładności przyjmuje wartość 1.

Czaszka o momencie bezwładności 1 i środku ciężkości $(0,0,0)$ jest znormalizowana.

**Zmiana układu współrzędnych:

W starym układzie współrzędnych wektory podstawowe przyjmowały wartości:

$$\begin{aligned} e_1 &= (1,0,0), \\ e_2 &= (0,1,0), \\ e_3 &= (0,0,1). \end{aligned}$$

W nowym układzie współrzędnych ortogonalne znormalizowane wektory własne przyjmują wartości:

$$\begin{aligned}v_1 &= (v_{11}, v_{12}, v_{13}), \\v_2 &= (v_{21}, v_{22}, v_{23}), \\v_3 &= (v_{31}, v_{32}, v_{33}).\end{aligned}$$

Wektor $a = a_1 e_1 + a_2 e_2 + a_3 e_3$ można wyrazić w nowym układzie współrzędnych jako $a = t_1 v_1 + t_2 v_2 + t_3 v_3$, gdzie t_i to nowe współrzędne. Wtedy:

$$a_1 e_1 + a_2 e_2 + a_3 e_3 = t_1 v_1 + t_2 v_2 + t_3 v_3 \quad (\#),$$

co po przemnożeniu skalarnych przez v_1 daje:

$$a_1 \langle e_1, v_1 \rangle + a_2 \langle e_2, v_1 \rangle + a_3 \langle e_3, v_1 \rangle = t_1 \langle v_1, v_1 \rangle = t_1.$$

Po przemnożeniu skalarnym przez v_2 i v_3 tego równania (#) otrzymujemy układ trzech równań określający nowe współrzędne:

$$\begin{cases}t_1 = a_1 v_{11} + a_2 v_{12} + a_3 v_{13} \\t_2 = a_1 v_{21} + a_2 v_{22} + a_3 v_{23} \\t_3 = a_1 v_{31} + a_2 v_{32} + a_3 v_{33}\end{cases}$$

które można zapisać jako macierz:

$$\begin{bmatrix} t_1 \\ t_2 \\ t_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} v_{11} & v_{12} & v_{13} \\ v_{21} & v_{22} & v_{23} \\ v_{31} & v_{32} & v_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \\ a_3 \end{bmatrix}.$$

**Analiza zróżnicowania genetycznego populacji
Pipistrellus pipistrellus i *Pipistrellus pygmaeus*
w Polsce**

Spis skrótów

AMOVA — analiza zmienności molekularnej

BIA — Białowieża

D_S Nei — standardowy dystans genetyczny Nei (Nei 1978)

DUN — Nowy Duninów

F_{IS} — współczynnik wsobności (imbredy) — prawdopodobieństwo, że osobnik ma w określonym locus dwa allele, które niedawno oddzieliły się od wspólnego przodka

F_{ST} — indeks utrwalenia, dystans genetyczny (Weir i Cockerham 1984; Michalakis i Excoffier 1996) oparty na porównaniu frekwencji alleli — prawdopodobieństwo, że dwie losowo wybrane gamety z tej samej subpopulacji będą miały to samo pochodzenie w odniesieniu do gamet wybranych z całej populacji

GOR — Górki

GRZ — Gaj-Grzmięca

KOS — Górki Kościelne

KRZ — Krzyż Wielkopolski

LUB — Lubnia

ŁYS — Łysomice

MYL — Mylin

NOW — Nowolesie

N_e — efektywna wielkość populacji

PCoord — główna współrzędna

PCoordA — analiza głównych współrzędnych

PIS — Jezioro Pisocne

POD — Poddębnie

PRZ — Przeworno

Pz — par zasad

Rel — miara spokrewniania osobników (Hamilton 1971)

R_{IS} — analog F_{IS} oparty na modelu mutacji krokowych

R_{ST} — (Slatkin 1995) odpowiednik F_{ST} oparty na modelu mutacji krokowych

Równowaga H-W — równowaga Hardy'ego-Weinberga

SAMOVA — przestrzenna analiza zmienności molekularnej

SIE — Siemysławice

SŁU — Słupski Młyn

Streszczenie

Celem projektu była analiza struktury genetycznej populacji karlika malutkiego, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774), i karlika drobnego, *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1825), w Polsce oraz określenie stopnia osiadłości tych gatunków i kierunku przepływu genów między koloniami. Ze względu na odnotowany w latach 60. XX wieku spadek liczebności wielu europejskich gatunków nietoperzy chciano także ocenić kondycję krajowych populacji karlików — stopień wsobności (inbredu), efektywną wielkość populacji, sprawdzić, czy populacje nie noszą znamion przejścia przez tzw. „szyjkę od butelki”. Dodatkowo skupiono się na ocenie różnic w strukturze genetycznej kryptycznych gatunków i przełożenia tych różnic na różnice w biologii i ekologii badanych gatunków, które jeszcze do połowy lat 90. XX wieku uznawane były za jeden gatunek — *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774).

Ocena zmienności genetycznej badanych gatunków przeprowadzona została na podstawie sekwencji ośmiu markerów mikrosatelitarnych. Sześć z zastosowanych markerów było już stosowanych przy badaniach tych gatunków, natomiast dwa pozostałe dobrano na zasadzie próbných amplifikacji z użyciem starterów, wykorzystywanych wcześniej w analizach innych gatunków z rodziny mroczkowatych (Vespertilionidae). W sumie na terenie Polski (w przypadku jednej kolonii — także i Ukrainy) odłowiono 368 osobników nietoperzy obu gatunków, w tym 188 osobników karlika malutkiego i 180 karlika drobnego. Przynależność gatunkowa odłowionych zwierząt została potwierdzona metodami molekularnymi (porównanie długości odpowiednich fragmentów *mtDNA*); dla wybranej grupy zwierząt zsekwencjonowano także fragment około 480 par zasad (pz) cytochromu *b*. Amplifikacja wszystkich ośmiu loci mikrosatelitarnych i zsekwencjonowanie uzyskanego produktu powiodły się dla 364 prób. Materiał pochodził z 16 kolonii — z 6 kolonii letnich karlika malutkiego i 10 kolonii letnich karlika drobnego oraz z jednej kolonii zimowej mieszanej (przy czym stwierdzono w niej obecność tylko jednego osobnika karlika drobnego). Kolonie karlika drobnego zlokalizowane były we wschodniej i centralnej Polsce, a odległości między nimi mieściły się w zakresie od 50 do 480 km; kolonie karlika malutkiego znajdowały się w zachodniej części kraju, a odległości między nimi wahały się w zakresie od 7 do 420 km.

Stwierdzono dużą zmienność genetyczną zarówno dla populacji karlika malutkiego, jak i dla populacji karlika drobnego; wartość heterozygotyczności obserwowanej wyniosła odpowiednio: 0,67 i 0,68 (0,78 i 0,75 po uwzględnieniu poprawki dla alleli zerowych). Test na zróżnicowanie populacji pod względem frekwencji alleli u obu gatunków dał bardzo istotne wyniki, jednak przy porównaniu par kolonii tylko dla 5 takich par każdego gatunku wynik był istotny statystycznie. Podobne wyniki dało oszacowanie (za pomocą F_{ST} , R_{ST} i standardowego dystansu Nei) dystansu genetycznego pomiędzy koloniami. Przykładowo wartość F_{ST} dla kolonii karlika malutkiego zawierała się w przedziale od 0,000 do 0,07 (7 na 21 porównań kolonii było istotnych statystycznie), a dla karlika drobnego zakres ten wynosił od -0,0002 do 0,16 (6 na 36 istotnych wyników). Wartość oszacowania F_{ST} dla całej populacji była wyższa dla karlika malutkiego niż dla karlika drobnego (0,014 versus 0,003), ale różnica między gatunkami nie była istotna statystycznie. U obu gatunków stopień wsobności był taki sam, a jego wartość wysoka (0,20). Zarówno dla karlika malutkiego, jak i dla karlika drobnego wskaźnik spokrewnienia był dodatni i wynosił odpowiednio 0,023 (0,009 wg innego oszacowania) i 0,011 (0,013), a różnica między gatunkami nie była istotna. U obu gatunków struktura genetyczna była słabo zaznaczona, nie są to jednak populacje panmiktyczne (u obu gatunków wykazano istotną pozytywną autokorelację dystansu genetycznego jako funkcji odległości geograficznej, dodatkowo dla karlika drobnego — istotną izolację przez dystans). Wyniki testu na strukturę populacji SAMOVA oraz PCoordA nie pozwoliły na podzielenie kolonii w obrębie badanych gatunków na podgrupy. Jedynym wyraźnym i wysoce istotnym statystycznie podziałem kolonii był podział na gatunki — wariancja między gatunkami wynosiła 19%. Takie wyniki mogą świadczyć o wysokim stopniu migracyjności badanych zwierząt, co potwierdziły rezultaty testu przypisania oraz testu na obecność migrantów w pierwszym pokoleniu. Przepływ genów prawdopodobnie odbywał się we wszystkich kierunkach. U karlika malutkiego intensywną migrację stwierdzono pomiędzy kolonią zimową, znajdującą się w Wielkopolsce, a położoną 250 km dalej na północ kolonią rozrodczą (stwierdzono 4 migrantów w pierwszym pokoleniu). Migracja odbywała się też pomiędzy kolonią zimową, a koloniami położonymi na południu (na Śląsku). Podobną sytuację zaobserwowano u karlika drobnego, u którego stwierdzono przeloty w wielu kierunkach, jakkolwiek z pewną tendencją w kierunku północnym. Uzyskane wyniki w porównaniu z tymi dla populacji karlików w Wielkiej Brytanii wskazują na nieco odmienny charakter naszych populacji — zarówno karlik malutki, jak i karlik drobny

wykazują większy stopień migracyjności (w populacjach z Wlk. Brytanii wartości F_{ST} były nieco wyższe od zaobserwowanych w Polsce). Wyniki testu przypisania, a także wartości F_{ST} dla populacji, wskazują również na to, że gatunki, choć nieznacznie, różnią się między sobą — karlik malutki wykazuje nieco bardziej osiadły charakter niż karlik drobny.

Interesujące rezultaty dały oszacowania efektywnej wielkości populacji oraz test na efekt „szyjki od butelki”. Wprawdzie dokładność oszacowań efektywnej wielkości populacji na podstawie markerów genetycznych jest wciąż dyskutowana i dla uzyskanych wyników należy przyjąć dość duży margines błędu, to wskazują one na zaskakująco niskie wartości — rzędu 100–200 osobników przy wielkości cenzusowej populacji przypuszczalnie porównywalnej z tą oszacowaną dla Wlk. Brytanii, którą oceniono na około 2,5 miliona osobników karlika malutkiego i około 1,5 miliona osobników karlika drobnego. Wyniki te, choć dyskusyjne, są zgodne z rezultatami testu na efekt „szyjki od butelki”, w którym uzyskano znaczący statystycznie wynik, świadczący o gwałtownym załamaniu się liczebności, zarówno w przypadku poszczególnych kolonii, jak i dla całych populacji gatunków.

Podsumowując, powyższe badania pozwoliły na jednoznaczną weryfikację istnienia obu kryptycznych gatunków w Polsce. Wykazana została przydatność do badań nad genetyką populacyjną dwóch niestosowanych dotąd u tych gatunków markerów mikrosatelitarnych. Ponadto uzyskane wyniki, poza oceną struktury genetycznej badanych gatunków, stopnia ich migracyjności i kierunku przepływu genów, rzuciły nowe światło na status populacji karlików w Europie Środkowej. Oba gatunki uważane są za jedne z najpospolitszych na kontynencie europejskim i jako jedyne z gatunków nietoperzy zamieszkujących Europę nie zostały zaliczone do gatunków ściśle chronionych i objętych II załącznikiem Konwencji Berneńskiej. Zaprezentowane wyniki pokazują, że ocena stopnia zagrożenia tych gatunków mogła być nazbyt optymistyczna — za wysoką liczebnością nie kryje się bowiem odpowiednio wysoki stopień zróżnicowania genetycznego, co czyni gatunki bardziej podatnymi na różnego rodzaju zagrożenia.

Wprowadzenie

Nietoperze (Chiroptera) są drugim (po gryzoniach) pod względem liczności gatunków rzędem ssaków. Bardzo długo należały do słabo poznanych grup zwierząt (Kulzer 1988). W ostatnich dwóch dekadach nastąpił niezwykle rozwój w badaniach tych ssaków i wiedzy o nich, nierozdzielnie związany z rozwojem technik badawczych (Kunz i Fenton 2003). Wiedza o tych niezwykłych zwierzętach jest jednak nadal niepełna. Wciąż odkrywano nowe gatunki nietoperzy, a dzieje się tak przede wszystkim dzięki zastosowaniu metod molekularnych. Zewnętrzne różnice morfologiczne bywają tak nieznaczne, że nawet wśród wydawałoby się powszechnie znanych europejskich gatunków nietoperzy odkrywano nowe gatunki kryptyczne. Tak było, jak już to opisano w pierwszej części pracy, w przypadku karlika malutkiego, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774), i karlika drobnego, *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1825), ale okazało się, że nie jest to przypadek wyjątkowy. W 2001 r. von Helversen i in. (2001) opisali nowy gatunek z rodziny mroczkowatych — nocka Alkatoe (*Myotis alcathoe* Helversen i Heller, 2001). Gatunek ten morfologicznie okazał się bardzo podobny do trzech innych: nocka wąsatka, *M. mystacinus* (Kuhl, 1817), z którym był zazwyczaj mylony, nocka Brandta, *M. brandtii* (Eversman, 1845), i *M. ikonnikovi* (Ognev, 1912). Wszystkie te gatunki różnią się jednak od siebie wyraźnie pod względem sekwencji dwóch genów mitochondrialnych: ND1 i 12S rRNA. Podobnie wśród europejskich gacków w ostatnich latach na podstawie badań sekwencji mitochondrialnego DNA wydzielono trzy nowe gatunki: gacka alpejskiego (*Plecotus macrobullaris* Kusjakina, 1965 — Kiefer i Veith 2002, Spitzenberger i in. 2002, 2003), gacka bałkańskiego (*P. kolombatovici* Dulić, 1980 — Kiefer i in. 2002) i gacka sardyńskiego (*P. sardus* Mucedda, Kiefer, Pidinchredda i Veith, 2002), również bardzo zbliżone do siebie pod względem cech morfologicznych (np. Mucedda i in. 2002, Spitzenberger i in. 2002).

Problem identyfikacji gatunkowej, jak również skryty i nocny tryb życia nietoperzy, powodują trudności w zgromadzeniu wiarygodnych danych na temat ich wymagań środowiskowych, struktury populacji, liczebności czy rozmieszczenia. Także w tego rodzaju badaniach metody molekularne okazują się niezwykle pomocne, porównanie poziomu zmienności sekwencji pozwala bowiem na wnioskowanie o wielu z wymienionych powyżej cech, a uzyskanie materiału genetycznego jest

niejednokrotnie łatwiejsze od długotrwałych obserwacji terenowych. Odkrycie szybko ewoluujących sekwencji genetycznych, takich jak mikrosatelitarne sekwencje jądrowego DNA, umożliwia badaczom prowadzenie prac naukowych na coraz niższych poziomach hierarchicznych — międzypopulacyjnych czy wręcz międzyosobniczych. Doskonałą ilustracją takich właśnie molekularnych badań na poziomie osobniczym może być praca Vonhofs i in. (2006), w której wykazano, że rodzeństwo z jednego miotu u występującego w Ameryce Północnej mroczka brunatnego, *Eptesicus fuscus* (Beauvois, 1796), bardzo często bywa przyrodnie, co może być istotnym czynnikiem wpływającym na strukturę populacji. Zjawisko to zresztą może potencjalnie występować u wielu innych gatunków nietoperzy, u których zaplemnienie jest oddzielone w czasie od zapłodnienia.

Wprawdzie w ostatnich latach pojawiły się prace na temat genetyki populacyjnej nietoperzy — np. dotyczące borowca wielkiego, *Nyctalus noctula* (Schreber, 1774) — Petit i Mayer (2000), Petit i in. (1999); gacka brunatnego, *Plecotus auritus* (Linnaeus, 1758) — Burland i in. (2001) oraz Furmankiewicz i Altringham (2007); czy podkasańca Schreibersa, *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817) — Miller-Butterworth i in. (2002, 2003) — jednak ich liczba nadal jest zaskakująco niska w porównaniu z liczbą prac dotyczących innych grup zwierząt. Takim szandarowym przykładem mogą być chociażby walenie (Cetacea), a przecież uzyskanie od nich materiału genetycznego wydaje się jeszcze trudniejsze niż od nietoperzy. Według Burland i Worthington-Wilmer (2001) do 2000 r. opublikowano około 60 prac opisujących mniej niż 70 gatunków nietoperzy (przy szacowanej wówczas przez autorów ich liczbie sięgającej 963 gatunków; aktualnie znamy ponad 1100 gatunków) z 7 na 18 znanych rodzin, podczas gdy w przypadku waleni tych prac było około 70 przy 80 znanych gatunkach tych zwierząt. Przydatność badań opartych na markerach genetycznych w przypadku tak specyficznej grupy zwierząt, jakimi są nietoperze, jest trudna do przecenienia. Nie tylko że nietoperze prowadzą skryty tryb życia i są zdolne do przemieszczania się na wielkie odległości, ale też cechuje je bardzo zróżnicowana i często złożona struktura socjalna, zróżnicowane zwyczaje godowe i rozrodcze, a także pokarmowe, jak również takie zjawiska jak rojenia letnie i jesienne (ang. *swarming*) (np. Furmankiewicz i Altringham 2007, Karlsson i in. 2002, Piksa 2008, Rivers i in. 2005, Veith i in. 2004). Dotychczasowe badania, oparte zarówno na markerach mitochondrialnego, jak i jądrowego DNA, przyczyniły się do lepszego poznania złożonej biologii nietoperzy. Przykładowo Veith i in. (2004) oraz Furmankiewicz i Altringham (2007) wykazali, że

podczas rojenia dochodzi do przepływu genów pomiędzy koloniami gacka brunatnego, który jest gatunkiem o silnej filopatryi u obu płci, a mimo to genetycznie nie ma silnie zaznaczonej struktury ani wysokiego stopnia spokrewnienia pomiędzy osobnikami w obrębie kolonii. Badania molekularne na poziomie populacyjnym przyczyniają się także do określenia takich czynników oddziałujących na populacje jak bariery geograficzne — np. Castella i in. (2000) dowiedli, że Cieśnina Gibraltarska jest barierą dla nocka dużego, *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797). Petit i Mayer (2000), w swoich badaniach nad europejskimi koloniami rozrodczymi i zimowymi borowca wielkiego, nie tylko że potwierdzili migracyjność badanego gatunku, ale także przedstawili możliwe kierunki migracji, które w przypadku tak małych zwierząt są bardzo trudne, jeśli niemożliwe, do zbadania metodami telemetrycznymi, a dane z obrączkowania są nieliczne ze względu na bardzo niski procent ponownie odławianych zwierząt. Z kolei Durrant i in. (2008) stwierdzili, że populacja nocka Bechsteina, *Myotis bechsteinii* (Kuhl, 1817), w Wielkiej Brytanii przeszła przez drastyczne załamanie się liczebności, które skutkowało znacznym obniżeniem różnorodności genetycznej (tzw. efekt „szyjki od butelki”). Kerth i in. (2002a, 2000b) oraz Kerth i Petit (2005) u tego samego gatunku zwrócili uwagę na różnice w migracyjności samic i samców, wykazując bardzo silną filopatrię samic i dużą migracyjność samców. Ruedi i Castella (2003) z kolei zbadali mechanizmy i kierunek ekspansji nocka dużego po cofnięciu się lodowca.

W przypadku karlików, które uważane są za jedne z najliczniejszych gatunków europejskich nietoperzy (Mitchell-Jones i in. 1999), wiele z aspektów ich biologii nie jest jeszcze poznanych, tym bardziej że wiele badań i obserwacji dokonanych przed odkryciem istnienia gatunków bliźniaczych straciło swoją wartość. Większa część z badań molekularnych karlików koncentrowała się na ich rozróżnieniu (Barratt i in. 1995 i 1997, Mayer i von Helversen 2001a i 2001b, Mayer i in. 2007) i zagadnieniach filogenetycznych (Benda i in. 2004, Huvla i in. 2004 i 2007), i dopiero w 2007 r. ukazała się praca dotycząca genetyki populacyjnej karlików malutkiego i drobnego z obszaru Wielkiej Brytanii (Racey i in. 2007). Autorzy ci potwierdzili w niej, że niezależnie od odległości geograficznej różnice w obrębie jednego z gatunków są mniejsze niż pomiędzy populacjami obu kryptycznych gatunków. Wykazali również w obrębie obu gatunków niewielką, ale istotną izolację genetyczną przez dystans, co według autorów może wskazywać na to, że do zapłodnienia samic dochodzi przed długodystansowymi jesiennymi wędrówkami tych zwierząt. U obu gatunków zróżnicowanie genetyczne pomiędzy koloniami nie było wysokie, ale gatunki różniły

się pomiędzy sobą. U karlika malutkiego zróżnicowanie było nieco wyższe, także izolacja przez dystans była silniej zaznaczona, co może wskazywać na bardziej osiadły charakter tego gatunku w porównaniu z karlikiem drobnym. Warto tutaj jednak zwrócić uwagę na fakt, że praca dotyczyła specyficznego terenu badań — Wielka Brytania jest wyspą i tu też przebiega granica zasięgu obu gatunków karlików. Różnice w zachowaniu nietoperzy pomiędzy Europą kontynentalną a Wyspami Brytyjskim były już notowane zarówno u innych gatunków nietoperzy, jak i u samych karlików. Przykładowo stwierdzono inny wybór schronień u borowiaczka, *Nyctalus leisleri* (Kuhl, 1817), który w Europie kontynentalnej zdaje się zajmować wyłącznie dziuple drzew (Ruczyński i Bogdanowicz 2005), podczas gdy w Irlandii kolonie macierzyste znajdują się na strychach (Shiel i Fairely 1999). W przypadku karlika malutkiego i drobnego wykazywano także różnice w wielkości kolonii, częstości ich zmieniania, a także w preferencjach środowiskowych. Średnia wielkość kolonii macierzystej karlika drobnego w Wielkiej Brytanii wynosi 200 osobników (Barlow i Jones 1999), podczas gdy w Czechach — około 60 osobników (Bartonička i in. 2008). Z kolei wielkość kolonii wpływa na termoregulację, a tym samym częstość zmieniania lokalizacji kryjówek (Haddow 1993, Barlow i Jones 1999). Częste zmiany kryjówek obserwowano w Europie kontynentalnej zarówno u karlika malutkiego (Feyerabend i Simon 2000), jak i karlika drobnego (Bartonička i in. 2008), przy czym dotyczyły one nie tyle przemieszczania się całej kolonii, ile jej części, zgodnie ze strategią obrony przed drapieżnictwem — *fission-fusion* — modelu obserwowanego także u innych nietoperzy z rodziny mroczkowatych, takich jak borowiec wielki (Willis i Brigham 2004) czy nocek Bechsteina (Kerth i König 1999). Z kolei badania nad koloniami karlika malutkiego i drobnego z Wielkiej Brytanii dowodzą bardzo rzadkich zmian kryjówek podczas sezonu rozrodczego (Davidson-Watts i in. 2006). Wiele wskazuje również na różnice pomiędzy Europą kontynentalną a Wielką Brytanią w stopniu migracyjności badanych gatunków, co może mieć kluczowe znaczenie dla formowania się ich struktury genetycznej. Najdłuższy odnotowany dystans pokonany przez karlika w Wielkiej Brytanii to jedynie 69 km (Avery 1991), podczas gdy w kontynentalnej Europie to 1123-km przelot trwający 70 dni pomiędzy Ukrainą a Bułgarią (Benda i in. 2003). Zebrano również dane na temat różnic w strategii rozrodu — w Wielkiej Brytanii formowanie się grup rozrodczych zaobserwowano późnym latem (Park i in. 1996), podczas gdy w Europie centralnej kojarzenie się tych zwierząt ma

miejsce w czasie lub po sezonowych migracjach późnym latem lub jesienią (Sachteleben i von Helversen 2006).

Celem niniejszej pracy była analiza struktury populacji karlików malutkiego i drobnego w Polsce. Kraj nasz, ze względu na swoje położenie w samym centrum Europy, stanowi reprezentatywne miejsce dla badań populacyjnych wielu gatunków nietoperzy z tego kontynentu, i może stanowić odniesienie np. dla wyników otrzymanych w Wielkiej Brytanii (Racey i in. 2007). Ponadto postanowiono położyć szczególny nacisk na znalezienie różnic w strukturze populacji, które można by przełożyć na różnice w zachowaniu czy ekologii badanych karlików. Dodatkowo chciano też ustalić takie właściwości badanych populacji, jak: jej efektywna wielkość, ewentualne wykrycie efektu „szyjki od butelki”, czy wyznaczenie kierunku przepływu genów, które pozwolą na określenie kondycji badanych populacji i wytyczenie właściwego kierunku działań na rzecz ochrony gatunkowej karlików.

By zrealizować powyższe założenia postanowiono określić zróżnicowanie genetyczne wyrażone jako heterozygotyczność obserwowana i spodziewana, bogactwo alleliczne, czy dystans genetyczny pomiędzy koloniami badanych gatunków, a także sprawdzić, czy istnieje izolacja przez dystans lub jakieś inne przejawy zaznaczonej struktury. Porównanie otrzymanych wyników z rezultatami badań nad strukturą populacji innych gatunków nietoperzy pozwoli na wnioskowanie o biologii karlików, w tym określenie stopnia ich osiadłości w Polsce. Dotychczasowe badania molekularne przeprowadzone u nietoperzy wskazują, że duże znaczenie dla kształtowania się struktury populacji ma migracyjność i stopień filopatrii (przywiązania do miejsca urodzenia) samców i samic — np. u migracyjnego borowca wielkiego (Petit i Mayer 2000, Petit i in. 1999) struktura populacji jest słabo zaznaczona, u osiadłego gacka brunatnego (Burland i in. 2001) struktura ta znajduje odbicie przede wszystkim w linii matczynej, natomiast u migracyjnego, ale wykazującego silną filopatrię samców i samic podkasańca Schreibersa jest ona wyraźna u obu płci (Miller-Butterworth i in. 2003). W przypadku karlików malutkiego i drobnego dane na temat stopnia ich migracyjności nie są jednoznaczne. Odsetek ponownie odławianych obrączkowanych nietoperzy jest bardzo niski. Z jednej strony znane są dane z obrączkowania świadczące o istnieniu osiadłych populacji w środkowej Europie (Hutterer i in. 2005), z drugiej — to właśnie z Europy pochodzą dane o wspomnianym już najdłuższym przelocie (Benda i in. 2003) oraz innych przelotach na odległości setek kilometrów (Kepka 1981, Sachteleben 1991, Gaisler i in. 2003). Na podstawie analiz morfologicznych proporcji i kształtu skrzydeł

Norberg i Rayner (1987) zaklasyfikowali karlika malutkiego *sensu lato* (badania wykonano przed wprowadzeniem rozróżnienia między gatunkami), jako gatunek migrujący na długie dystanse. Również eksperymenty z wypuszczaniem nietoperzy z dala od kolonii macierzystych wykazały, że są one zdolne do powrotu z dalekich odległości, nawet 300 km (Roer 1989). Za prawdopodobne zazwyczaj przyjmuje się, że populacje z zachodniej i wschodniej Europy są osiadłe i przemieszczają się 10–50 km między koloniami rozrodczymi a zimowymi, natomiast tam, gdzie zimy są surowsze, czyli na wschodzie i północy zasięgu, populacje migrują (Sachanowicz i Ciechanowski 2005). Uzyskane dane być może rzucają nowe światło na charakter polskiej populacji karlików. Ponadto wydaje się, że może istnieć różnica w stopniu migracyjności obu gatunków. Pomimo licznych stwierdzeń kolonii rozrodczych karlika drobnego w Polsce, obserwacje hibernujących tu karlików drobnych były sporadyczne i dotyczyły zazwyczaj pojedynczych osobników (należy jednak pamiętać, że rozróżnienie tych gatunków podczas hibernacji jest niezwykle trudne, a przed 1993 r. gatunki te w ogóle nie były rozróżniane). Jeśli rzeczywiście nietoperze te różnią się od siebie pod względem stopnia osiadłości, to bardziej migracyjny charakter karlika drobnego powinien znaleźć odbicie w jego strukturze genetycznej, która będzie mniej zaznaczona niż u karlika malutkiego. Postanowiono także określić, jaka jest intensywność i kierunki przepływu genów pomiędzy koloniami karlików, co nie tylko pozwoli na wnioskowanie o ich stopniu migracyjności, ale może także przyczynić się do poznania ewentualnych kierunków ekspansji (Arlettaz i in. 2000). Zjawisko ekspansji zaobserwowano dla pokrewnego gatunku — karlika średniego *Pipistrellus kuhlii* (Kuhl, 1817) (Sachanowicz i in. 2006), którego zasięg przesuwają się na północ Europy, a jako proponowane mechanizmy tego zjawiska wymienia się nie tyle zmiany klimatyczne, co przystosowanie się gatunku do życia w siedzibach ludzkich i jego stosunkową plastyczność ekologiczną (Bogdanowicz 2004, Sachanowicz i in. 2006). Karliki malutki i drobny również wykazują duży stopień synantropizacji, a ich kryjówki znajdują się zazwyczaj w budynkach, najczęściej domach mieszkalnych i domkach letniskowych (Sachanowicz i Ciechanowski 2005). Polska jest o tyle ciekawym miejscem dla badań różnicowania genetycznego karlików, że być może przebiega tutaj wschodnia granica występowania karlika malutkiego, gdyż jak dotąd w północno-wschodniej części kraju nie odnotowano jego obecności (Rachwald i Szkudlarek 2001, Sachanowicz i Ciechanowski 2005). Gdyby stwierdzony został przepływ genów w kierunku wschodnim, byłby to przyczynek do podejrzeń ekspansji tego gatunku na wschód.

Cechy morfologiczne pozwalające na identyfikację obu gatunków nie są ściśle określone (Dietz i von Helversen 2004, Häussler i in. 2000). Za cechą diagnostyczną uznaje się różnicę w użytkowaniu skrzydeł z zastrzeżeniem, że może ona nie być wykształcona u osobników młodocianych. W Polsce odnotowywano jednak obecność dorosłych osobników o cechach pośrednich, tzn. z użytkowaniem jednego skrzydła odpowiadającemu karlikowi malutkiemu, a drugiego odpowiadającemu karlikowi drobnemu (inf. ustne G. Gołębiak, własne obserwacje). Molekularna weryfikacja identyfikacji gatunkowej pozwoli dostarczyć pewnych danych o występowaniu obu gatunków karlików w Polsce. Ze względu na brak rozróżniania pomiędzy tymi gatunkami do lat 90. oraz istniejące nadal trudności z ich rozróżnianiem, wiedza na temat ich rozmieszczenia jest niepełna dla całego obszaru Europy. Wiadomo, że swoim zasięgiem obejmują one niemal cały kontynent — na północy do 63–64° szerokości geograficznej (w Skandynawii sięgają do atlantyckiego wybrzeża Norwegii, w Rosji do okolic Moskwy; Dietz i in. 2007, Sachanowicz i Ciechanowski 2005). W większości krajów Europy stwierdzono ich sympatryczne występowanie; dotyczy to: m. in. Wielkiej Brytanii, Grecji, Szwajcarii i południowych Niemiec, Polski, Czech (Bryja 2009, Mayer i Helversen 2001a; Papadatou i in. 2008, Rachwald i Szkudlarek 2001). Wiadomo też, że karlik drobny dociera dalej na północ i północny-wschód — licznie występuje na Ukrainie i w Rosji, odnotowywany był na Kaukazie i Syberii. podczas gdy karlik malutki jest liczniejszy w środkowej i zachodniej Europie, gdzie występowanie karlika drobnego ma raczej charakter wyspowy (Dietz i in. 2007, Sachanowicz i Ciechanowski 2005). W jednej z hipotez zaproponowano, że karlik drobny występuje na krawędzi zasięgu karlika malutkiego (Barratt i in. 1997). Jednak badania filogenetyczne Hulvy i in. (2004, 2007), a także badania Rachwalda i Szkudlarka (2001) nad występowaniem tych gatunków w Polsce zaprzeczają tej hipotezie — karlik drobny był odnotowywany na południu kraju. Jak już wspomniano nie stwierdzono jednak obecności karlika malutkiego na północnym-wschodzie Polski.

Badania oparte na porównywaniu sekwencji mikrosatelitarnych, których tempo mutacji znacznie przewyższa tempo mutacji innych markerów [np. ocenia się, że tempo mutacji punktowych wynosi 10^{-9} – 10^{-10} na jedną pozycję na rok (Li 1997), podczas gdy u myszy laboratoryjnych tempo mutacji sekwencji mikrosatelitarnych oszacowano na 10^{-3} – 10^{-4} (Dallas 1992)], pozwalają na ocenę stosunkowo niedawnych zjawisk zachodzących w populacji. Możliwe staje się wykrycie efektu „szyjki od butelki”, czyli skutku gwałtownego załamania liczebności populacji, które miało miejsce zaledwie

kilkadziesiąt pokoleń wstecz (Cornuet i Luikart 1996, Luikart i Cornuet 1998). Jest to o tyle ważne, że choć pod względem liczebności populacja mogła już powrócić do dawnego stanu, nadal może się w niej utrzymywać niski poziom różnorodności genetycznej, co ma duże znaczenie dla oceny kondycji danej populacji i podejmowania decyzji o sposobach ochrony gatunkowej. Dlatego też postanowiono sprawdzić, czy w populacjach karlików malutkiego i drobnego — których liczebność w Europie i Polsce szacowana jest na bardzo wysoką, ale podlega silnym fluktuacjom — także efektywna wielkość populacji jest wysoka i czy nie ma przejawów mogących świadczyć o efekcie „szybki od butelki”. Oszacowanie cenzusowej wielkości populacji nietoperzy jest bardzo trudne, jednak na podstawie prowadzonego od lat w wielu krajach Europy monitoringu zimowisk tych zwierząt, ocenia się, że w latach 60. XX wieku doszło do drastycznego spadku liczebności nietoperzy, związanego przede wszystkim ze stosowaniem pestycydów (Ciechanowski i Sachanowicz 2005). Z kolei z danych Centrum Informacji Chiropterologicznej wynika, że w Polsce od połowy lat 80. XX wieku liczebność nietoperzy powiększa się, co związane jest przede wszystkim z wycofywaniem z użycia trujących środków owadobójczych oraz ze zmniejszeniem zanieczyszczenia środowiska.

Uzyskane wyniki pozwolą także na dokonanie częściowych porównań (przede wszystkim w aspekcie dystansów genetycznych pomiędzy koloniami macierzystymi karlików malutkich i drobnych oraz stopnia osiadłości tych gatunków) z rezultatami badań przeprowadzonymi równoległe do tego projektu na podobnej liczbie kolonii i osobników (ale z zastosowaniem nieco odmiennego zestawu markerów mikrosatelitarnych) pochodzących głównie z obszaru Republiki Czeskiej oraz Słowacji (Bryja i in. 2009).

Materiał i metody

Zbiór prób

Zwierzęta odławiano od maja do sierpnia w latach 2006 i 2007. Przy odłowach używano sieci ornitologicznych o oczkach 16x16 mm; w miejscach, w których znajdował się pojedynczy wylot kolonii i w miarę dostępnym miejscu, stosowano pułapkę harfową własnej konstrukcji (Ryc. 1).



Rycina 1. Stosowana przy odłowach pułapka harfowa.

Część materiału pochodziła od martwych osobników znalezionych przy koloniach. Próby z Ukrainy uzyskane zostały w ramach współpracy z Tomášem Bartoničką i Zdenkiem Řehákiem (Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska). Próby z Krzyża Wielkopolskiego pobrane zostały podczas interwencji OTON-u, podczas której przenoszono całą kolonię nietoperzy z remontowanego strychu. Materiał pochodził przede wszystkim z letnich kolonii rozrodczych. Wyjątek stanowiła kolonia z Krzyża Wielkopolskiego, której status nie był do końca jasny — początkowo uznana została za wczesną kolonię rozrodczą (odkryto ją w marcu), była jednak bardzo liczna i na podstawie identyfikacji, opartej na cechach morfologicznych, stwierdzono, że składała się zarówno z osobników należących do karlika malutkiego, jak i drobnego.

Dlatego przyjęto, że była to kolonia zimowa, co jest znaczące przy interpretacji wyników, bowiem zwierzęta z kolonii zimowej mogą pochodzić z bardziej odległych miejsc. W sumie materiał pochodził z 16 kolonii — z 6 kolonii letnich karlika malutkiego i 10 kolonii letnich karlika drobnego oraz z jednej kolonii zimowej mieszanej (w tym ostatnim przypadku na 93 osobniki, od których pobrano tkanki do badań genetycznych tylko jedna należała do karlika drobnego; Tab. 1).

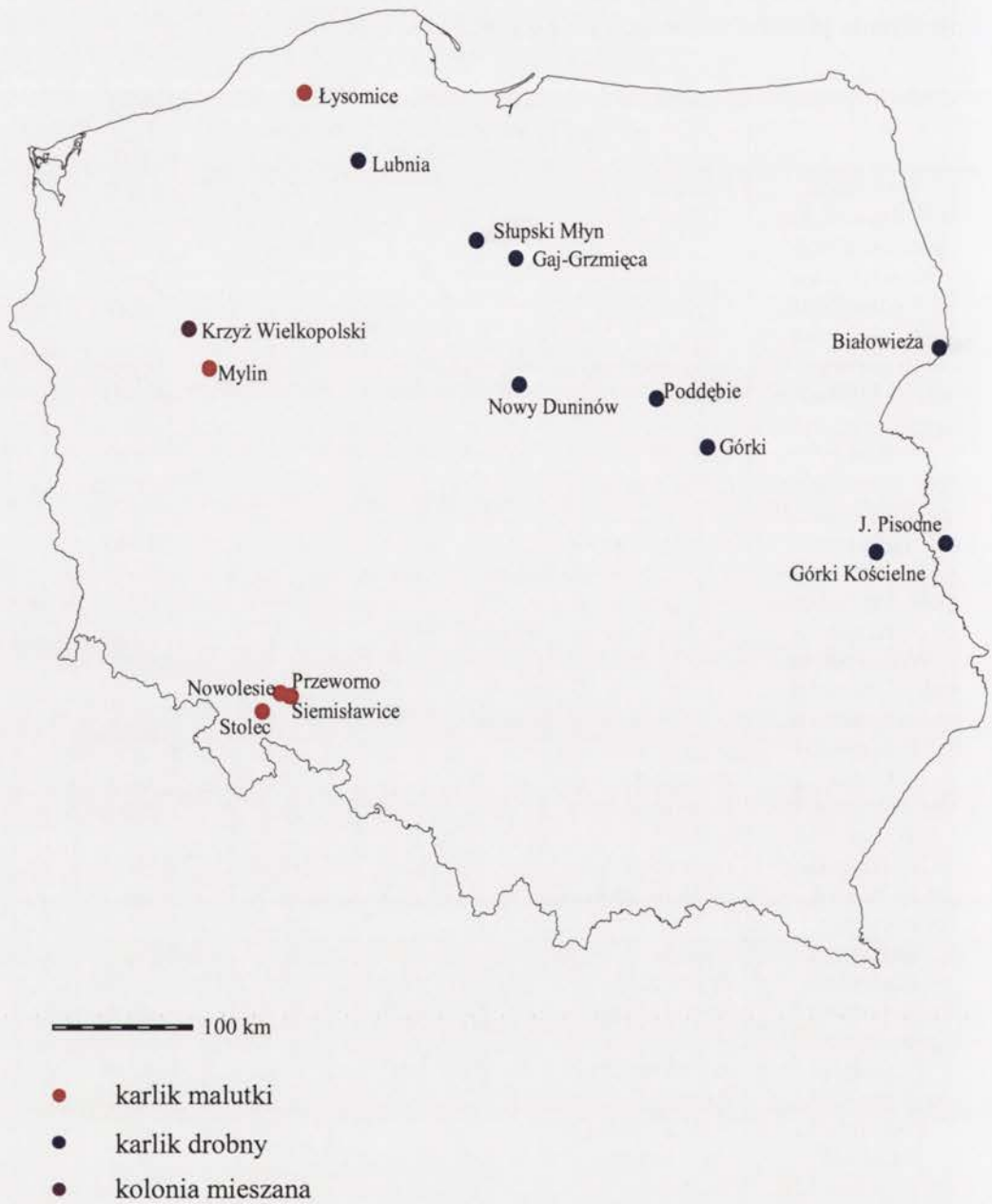
Wszystkie kolonie znajdowały się w budynkach; w większości były to budynki opuszczone, czy rzadko używane (stare szopy, niezagospodarowane strychy, wieżyczki), ale nie zawsze, jak w przypadku kolonii ze Stolca, która od paru lat pojawia się regularnie w szczelinach okiennych i przy dachu zamieszkałego domu jednorodzinne. Kolonie karlika drobnego zlokalizowane były we wschodniej i centralnej Polsce, a odległości między nimi mieściły się w zakresie od 50 do 480 km, natomiast kolonie karlika malutkiego znajdowały się w zachodniej części kraju, a odległości między nimi mieściły się w przedziale od 7 do 420 km (Ryc. 2).

W dalszej części pracy w tekście stosowane będą pełne nazwy kolonii, natomiast w tabelach i na rycinach używane będą skróty ich nazw (trzy pierwsze litery nazwy, w niektórych przypadkach, aby uniknąć powtórzeń, trzy pierwsze litery drugiego członu nazwy: patrz „Spis skrótów”). U odłowionych zwierząt określano: wiek, płeć, masę ciała oraz cechy morfologiczne służące do wstępnej identyfikacji gatunkowej (tj. użytkowanie błony lotnej, kolor futra, obecność bruzdy na nosie, długość przedramienia; Dietz i von Helversen 2004). Wyjątek stanowiły zwierzęta z kolonii z Krzyża Wielkopolskiego, u których cechy te nie zostały określone podczas pobierania prób.

Od schwytanych zwierząt pobierano sterylną igłą biopsyjną fragment błony lotnej o średnicy 2–3 mm zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Whorthington-Wilmer i Barratt (1996; zezwolenie DLOPiK-op/Ozgi-4200/IV.D-18/7168/06/aj). Przyjmuje się, że błona lotna nietoperzy ma duże zdolności regeneracyjne (de facto, do pełnego zrośnięcia się fragmentu błony lotnej o średnicy 3 mm dochodzi w ciągu 16 dni; Weaver i in., w druku), a pobranie jej małego fragmentu nie powoduje długotrwałego bólu — a więc i stresu — zatem nie wpływa ujemnie na normalne funkcjonowanie i zdolności przetrwania zwierzęcia. Po pobraniu wycinka i zdezynfekowaniu miejsca biopsji zwierzęta wypuszczane były na wolność w miejscu złapania. Pobrane próbki przechowywano w 95% etanolu w temperaturze -20°C.

Tabela 1. Miejsce odłowów, gatunek, liczba i płeć odłowionych zwierząt (bez określenia płci dla zwierząt z Krzyża Wlk.).

Miejscowość	Lokalizacja	Szerokość geograficzna (N)	Długość geograficzna (E)	Gatunek	Liczba samic	Liczba samców
Nowolesie woj. dolnośląskie, pow. strzebiński	wieża kościelna	50 ° 42 ' 09,5 "	17 ° 03 ' 27,1 "	karlik malutki	7	
Siemysławice woj. dolnośląskie, pow. strzebiński	opuszczony strych	50 ° 41 ' 14,8 "	17 ° 09 ' 06,7 "	karlik malutki	3	
Przeworno woj. dolnośląskie, pow. strzebiński	belki stropowe szopy	50 ° 41 ' 11,5 "	17 ° 09 ' 55,4 "	karlik malutki	22	4
Stolec woj. dolnośląskie, pow. ząbkowicki	szczeliny przy dachu domu	50 ° 35 ' 22,5 "	16 ° 53 ' 00 "	karlik malutki	19	4
Poddębnie woj. mazowieckie pow. legionowski	dom letniskowy	52 ° 28 ' 52,1 "	20 ° 54 ' 07,5 "	karlik drobny	13	2
Krzyż Wielkopolski woj. wielkopolskie, pow. czarnkowsko-trzcianecki	strych domu	52 ° 52 ' 46 "	16 ° 00 ' 29,1 "	karlik malutki		92
				karlik drobny		1
Górki woj. mazowieckie, pow. miński	opuszczona drewniana chata w lesie	52 ° 10 ' 38,4 "	21 ° 24 ' 59,8 "	karlik drobny	22	10
Gaj-Grzmiąca woj. kujawsko-pomorskie, pow. brodnicki	drewniany działający młyn	53 ° 20 ' 33,3 "	19 ° 26 ' 51,1 "	karlik drobny	17	8
Białowieża woj. podlaskie, pow. hajnowski	strych domu	52 ° 42 ' 04,9 "	23 ° 52 ' 10,2 "	karlik drobny	16	14
Łysomice woj. pomorskie, pow. słupski	szczeliny przy dachu	54 ° 19 ' 51,5 "	17 ° 09 ' 31 "	karlik malutki	34	
Lubnia woj. pomorskie, pow. chojnicki	leśniczówki	53 ° 55 ' 43,5 "	17 ° 45 ' 07,6 "	karlik drobny	12	3
Górki Kościelne woj. lubelskie, pow. parczewski	szczeliny przy dachu leśniczówki	53 ° 55 ' 43,5 "	17 ° 45 ' 07,6 "	karlik drobny	12	3
Nowy Duninów woj. mazowieckie, pow. płocki	drewniana kaplica na wodzie	51 ° 29 ' 54,5 "	23 ° 05 ' 24,1 "	karlik drobny	22	7
Mylin woj. wielkopolskie, pow. międzychodzki	wieżyczka domu mieszkalnego	52 ° 34 ' 49,1 "	19 ° 28 ' 24,3 "	karlik drobny	1	1
	ambona w lesie	52 ° 38 ' 57,7 "	16 ° 14 ' 08,6 "	karlik malutki	1	1
Słupski Młyn woj. kujawsko-pomorskie, pow. grudziądzki	drewniany nieużytkowany młyn	53 ° 27 ' 03,1 "	19 ° 01 ' 38,6 "	karlik drobny	1	1
J. Pisocne Ukraina	brak danych	51 ° 31 ' 19,3 "	23 ° 48 ' 13 "	karlik drobny	30	



Rycina 2. Rozmieszczenie kolonii karlika malutkiego i karlika drobnego, z których pochodziły próby.

Metody laboratoryjne

Izolacja materiału genetycznego z błony lotnej zwierząt przeprowadzona została z zastosowaniem gotowego zestawu oraz protokołu postępowania „Genomic mini” (A&A Biotechnology). Następnie przeprowadzana była identyfikacja gatunków według procedury opisanej przez Kańucha i in. (2007), przy czym z nieco zmodyfikowanymi warunkami łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) — z dłuższą denaturacją wstępną (95 °C, 15 min) i z zastosowaniem zestawu odczynników do amplifikacji „Multiplex Kit” (Qiagen). W reakcji PCR zastosowano dwie pary starterów (zewnętrznych PIP-F i PIP-R oraz wewnętrznych Ppyg-F i Ppip-F2; Kańuch i in. 2007). Otrzymany produkt amplifikacji poddawany był elektroforezie na żelu agarozowym (2,5%) w celu rozdzielenia produktów o odpowiedniej długości i otrzymania charakterystycznego dla danego gatunku układu prążków — prążka kontrolnego pomyślnej amplifikacji na wysokości 320 par zasad (pz) dla obu gatunków karlika oraz prążka specyficznego na wysokości 160 pz dla karlika malutkiego i 230 pz dla karlika drobnego. Wszystkie z odłowionych nietoperzy zaklasyfikowane zostały do badanych gatunków z wyjątkiem czterech osobników, które znalezione zostały martwe pod kolonią i ich stan zachowania utrudniał identyfikację na podstawie cech morfologicznych, a które najprawdopodobniej były młodymi osobnikami karlika większego, *Pipistrellus nathusii* (Keyserling et Blasius, 1839).

Przynależność części osobników do danego gatunku określona została na podstawie sekwencji mitochondrialnego DNA o długości około 480 pz. Przy amplifikacji materiału genetycznego zastosowano startery PipiL1 oraz Pipi440H (zaprojektowane przez M. Gajewską, dane niepublikowane). Przeprowadzone były dwie reakcje PCR — pierwsza z oboma starterami, następnie otrzymany produkt oczyszczono zestawem „Clean up” (A&A Biotechnology) i przeprowadzono PCR sekwencyjny ze starterem PipiL1 z użyciem zestawu „CEGTMDTCS Quick Start Kit” (Beckman Coulter). Obecność produktu amplifikacji była potwierdzana elektroforezą na żelu agarozowym. W przypadku pomyślnej amplifikacji produkt sekwencjonowano na ośmiokapilarnym sekwenatorze (Beckman Coulter SQ 8000).

Przeanalizowano osiem autosomalnych loci mikrosatelitarnych. Markery mikrosatelitarne amplifikowane były w dwóch zestawach (pięć par starterów oraz trzy pary starterów; Tab. 2) z zastosowaniem gotowych zestawów odczynników Multiplex

PCR Kit (Qiagen). Startery były znakowane cyjaninowymi barwnikami fluorescencyjnymi Oligomery WellRED (na licencji firmy Beckman Coulter Inc.) Detekcja i określenie długości otrzymanych produktów przeprowadzone zostały na wymienionym już powyżej sekwenatorze Beckman Culter SQ 8000.

Tabela 2. Zastosowane startery i rodzaj użytego barwnika oraz zakres amplifikowanych alleli karlików malutkiego i drobnego.

Zestaw multiplex	Para starterów dla poszczególnych loci		Długości alleli (pz)		Barwnik
			Karlik malutki	Karlik drobny	
Zestaw pierwszy	Ppip02-F	Ppip02-R	118–140	120–142	D3
	Ppip03-F	Ppip03-R	189–243	191–221	D4
	Ppip04-F	Ppip04-R	193–233	191–223	D3
	Ppip05-F	Ppip05-R	168–192	170–198	D2
	Ppip06-F	Ppip06-R	114–190	90–158	D4
Zestaw drugi	Ppip01-F	Ppip01-R	145–179	151–185	D2
	EF04-F	EF04-R	205–241	205–247	D2
	EF15-F	EF15-R	85–115	85–125	D3

Sześć par z zastosowanych starterów (Ppip01–Ppip06) pochodziło z pracy Racey'a i in. (2007; zostały one specjalnie zaprojektowane przez autorów do badań nad populacjami karlika malutkiego i drobnego), dwa kolejne wybrane zostały na podstawie próbnych amplifikacji losowo wybranych prób ze starterami wykorzystywanymi dotychczas w badaniach nad innymi gatunkami nietoperzy z rodziny mroczkowatych (Vespertilionidae). Taka metoda próbnej między gatunkowej amplifikacji jest dość powszechnie stosowana u nietoperzy (Mayer i in. 2000; Miller-Butterworth i in. 2002; Vonhof i in. 2002), a jest tańsza i mniej skomplikowana metodycznie niż projektowanie nowych starterów. Z pośród kilku przetestowanych par starterów wybrano dwie pary stosowane wcześniej u mroczka brunatnego EF04 i EF15 (Vanhof i in. 2002). Wszystkie loci mikrosatelitarne zostały pomyślnie zamplifikowane dla 364 z 368 osobników (amplifikacja nie powiodła się u dwóch osobników karlika malutkiego i dwóch osobników karlika drobnego). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło 0,3 µl każdego ze starterów w stężeniu 2 µM; 1,5 µl izolatu DNA; 5 µl Multiplex PCR Kit (Qiagen) i 1,5 µl wody.

Łańcuchowa reakcja amplifikacji (PCR) przeprowadzana była w następujących warunkach:

- denaturacja wstępna (95°C przez 15 minut);

w 35 cyklach:

- denaturacja (94°C przez 30 s);
- przyłączenie starterów (61°C przez 90 s);
- elongacja (72°C przez 90 s);
- elongacja końcowa (60°C przez 30 s).

W przypadku powtórek dla pojedynczych niezamplifikowanych loci w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło 0,5 µl każdego z pary starterów w stężeniu 2 µM; 1,0 µl izolatu DNA; 5 µl PCR Kit (Qiagen) i 3 µl wody, a łańcuchowa reakcja amplifikacji (PCR) przeprowadzana była w warunkach:

- denaturacja wstępna (94°C przez 3 minuty);

w 35 cyklach:

- denaturacja (94°C przez 30 s);
- przyłączenie starterów (55°C przez 45 s);
- elongacja (72°C przez 45 s);
- elongacja końcowa (55°C przez 60 s).

Analiza wyników

Analiza sekwencji mitochondrialnego DNA

Sekwencje *mtDNA* analizowane były w programie *BioEdit* (Hall 2007) — sekwencje zostały przyrównane algorytmem Clustal W Multiple Alignment i porównane z sekwencjami fragmentów cytochromu *b* dla obu gatunków z bazy GeneBank, co pozwoliło na jednoznaczne określenie przynależności gatunkowej badanych okazów (Załącznik I).

Analiza sekwencji loci mikrosatelitarnych

ANALIZA BŁĘDÓW AMPLIFIKACJI

To, czy w wartościach długości nukleotydowej danej sekwencji mikrosatelitarnej nie ma błędów grubych (źle przepisanych wartości, nieparzystych powtórzeń dla loci o parzystych powtórzeniach itp.), sprawdzono w programie MicroChecker Version 2.2.3 (van Oosterhout i in. 2003). Dodatkowo w tym samym programie sprawdzono metodą Monte-Carlo, czy nie ma specyficznych odchyień od równowagi Hardy'ego-Weinberga, mogących świadczyć o błędach amplifikacji, takich jak: allele zerowe (tzn. allele, które nie amplifikują się w reakcji PCR), niewielkie zmiany w wielkości amplifikujących się alleli w reakcji PCR (ang. *stuttering*), czy też błędy wynikające z mniejszej efektywności amplifikacji dłuższych alleli od krótszych (ang. *large allele dropout*). Zważywszy na brak problemów z amplifikacją w przypadku badanych prób, uznano, że można założyć, że frekwencja homozygot zerowych jest bliska zeru, a więc do odtworzenia poprawionej frekwencji heterozygot zerowych wykorzystano poprawkę Brookfielda 1 (Brookfield 1996).

Ze względu na różne źródła odstępstw od równowagi Hardy'ego-Weinberga (obserwowane odchylenia od równowagi mogą być rezultatem działania innych czynników niż allele zerowe, przykładowo wysokiego stopnia wsobności czy specyficznej struktury populacji) oraz dyskusyjny sposób odnajdywania alleli zerowych (różne rodzaje poprawek w zależności od przyjętych założeń) analizy zostały wykonane dla dwóch zestawów danych: danych oryginalnych oraz danych, w których nadmiarowe

homozygoty zostały poprawione na heterozygoty zgodnie z poprawką Brookfielda 1. W przypadku analiz, w których badane były związki między osobnikami a nie koloniami, ze względu na to, że przy znajdowaniu alleli zerowych możliwe jest określenie ich frekwencji w grupie, ale nie przypisanie ich do odpowiednich osobników, zastosowano jedynie dane oryginalne. Podobnie, w przypadku analiz dotyczących porównania liczby powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnych, ze względu na nieznaną rzeczywistą liczbę powtórzeń w allelach zerowych, zastosowano tylko dane oryginalne. Wszystkie te przypadki zostały zaznaczone w tekście.

Do konwersji plików wsadowych dla poszczególnych programów do analiz genetycznych wykorzystano program CREATE 1.0 (Coombs i in. 2007).

NIERÓWNOWAGA SPRZĘŻEŃ

Do sprawdzenia, czy poszczególne loci dziedziczone są niezależnie, co jest podstawą przy doborze zestawu dobrych markerów mikrosatelitarnych, wykorzystano test na nierównowagę sprzężeń z programu Arlequin (Excoffier i in. 2005), oparty na 10 000 łańcuchu Markowa i 1000 kroków dememoracyjnych. Test ten przeprowadzono odrębnie dla poszczególnych kolonii.

RÓWNOWAGA HARDY'EGO-WEINBERGA

To, czy populacja znajduje się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga (H-W) sprawdzane było przy pomocy testu opartego na 1000 randomizacjach, wykorzystującego do tego celu dwie statystyki: F_{IS} i F_{IT} . Test przeprowadzono w programie Fstat (Goudet 1995, 2001). Aby określić, czy odchylenie od równowagi dotyczy deficytu czy nadmiaru heterozygot, zastosowano test na równowagę H-W z hipotezą alternatywną, mówiącą odpowiednio o deficycie lub nadmiarze heterozygot. Testy przeprowadzono zarówno dla poszczególnych loci i całych populacji, jak i dla wszystkich kolonii. Do tego celu wykorzystano program Genepop on The Web (Raymond i Rosset 1995). Wszystkie testy wykonano na próbach oryginalnych i po uwzględnieniu poprawek dla alleli zerowych.

PODSTAWOWE STATYSTYKI

Dla obu badanych populacji karlika malutkiego i karlika drobnego, jak i dla poszczególnych kolonii (tylko dla prób oryginalnych) zostały określone w programie GeneAlex (Peakall i Smouse 2006) następujące charakterystyki:

- Średnia liczba alleli w poszczególnych loci;
- Średnia liczba unikatowych alleli (ang. *private alleles*);
- Średnia liczba alleli o frekwencji w populacji mniejszej niż 5%;
- Średnia liczba alleli o frekwencji w populacji większej niż 5% a mniejszej niż 25%;
- Średnia liczba alleli o frekwencji w populacji większej niż 5% a mniejszej niż 50%;
- Średnia liczba alleli efektywnych;
- Liczba osobników w danej kolonii z jednym lub więcej unikatowym allelem.

Za pomocą programu Fstat (Goudet 1995 i 2001) określono dodatkowo bogactwo alleliczne, czyli także miarę liczby alleli, ale z korektą uwzględniającą liczebność próby, co umożliwia bezpośrednio porównywanie prób o różnych wielkościach. W tym samym programie wyliczono także współczynnik wsobności F_{IS} dla prób oryginalnych i po poprawce dla alleli zerowych. Istotność tego oszacowania na poziomie 5% została sprawdzona za pomocą testu permutacji (1300 dla karlika malutkiego i 1600 dla drobnego).

Heterozygotyczność spodziewana i obserwowana dla prób oryginalnych i z uwzględnionymi poprawkami dla alleli zerowych zostały policzone w programie Arlequin (Excoffier i in. 2005).

Istotność różnic pomiędzy średnimi liczbami alleli o różnych frekwencjach dla gatunków sprawdzono przy pomocy testu Manna-Whitney'a w programie PAST, ver. 1.34 (Hammer i in. 2001).

ZRÓŻNICOWANIE POPULACJI

Test na różnicowanie oparty na statystyce G (ang. *population differentiation test*; Goudet i in. 1996), czyli test na różnicowanie pod względem frekwencji alleli dla populacji obu gatunków, przeprowadzono w programie Fstat (Goudet 1995, 2001), zarówno dla prób oryginalnych, jak i z poprawionymi allelami zerowymi. Przyjęto założenie, że populacje nie znajdują się w równowadze H-W, liczbę permutacji 1000 i 5% poziom istotności. Przy zastosowaniu tego samego testu, ale z poprawką Bonferoniego dla wielokrotnych porównań, sprawdzono również, czy istnieje różnicowanie pomiędzy parami poszczególnych kolonii w obrębie gatunku (dla prób oryginalnych i z poprawionymi allelami zerowymi).

DYSTANS GENTYCZNY

W obliczeniach dystansów genetycznych opartych na frekwencji alleli, takich jak F_{ST} czy dystans Nei (D_S Nei), posłużono się danymi bezpośrednio odczytanymi przez automatyczny sekwenator, czyli długością nukleotydową danej sekwencji mikrosatelitarnej razem z sekwencjami flankującymi. Natomiast w przypadku miar dystansu opartych na długości alleli, takich jak R_{ST} , w których kluczowe znaczenie ma rzeczywista liczba powtórzeń w sekwencji mikrosatelitarnej, ze względu na nieznaną długość sekwencji flankujących dla użytych starterów, posłużono się danymi zmodyfikowanymi w następujący sposób: najkrótszy odnotowany z alleli dla danego locus przyjęto za allel o jednym powtórzeniu, jego długość odjęto od wszystkich pozostałych alleli i otrzymane wartości podzielono przez wielkość motywu powtórzeń, czyli dwa, bo wszystkie badane sekwencje miały powtórzenia dinukleotydowe.

Dystans F_{ST} pomiędzy koloniami (ang. *pairwise* F_{ST} ; Michalakis i Excoffier 1996, Weir i Cockerham 1984) oraz dystans R_{ST} (ang. *pairwise* R_{ST} ; Slatkin 1995) policzono w programie Arlequin (Excoffier i in. 2005), a ocena istotności statystycznej dla tych dystansów między poszczególnymi parami kolonii została przeprowadzona na podstawie testu opartego na 1000 permutacji. Natomiast dystans Nei pomiędzy koloniami (Nei 1978, ang. *unbiased standard Nei distance*) został wyznaczony w programie SPAGeDi (Hardy i Vekemans 2002). Dystanse F_{ST} oraz Nei wyznaczono zarówno dla prób oryginalnych, jak i dla prób z poprawionymi allelami zerowymi. Za pomocą testu Mantela (Fstat; Goudet 1995, 2001) sprawdzono także korelacje pomiędzy macierzami wyznaczonych dystansów genetycznych.

PORÓWNANIE GATUNKÓW

Porównanie populacji obu gatunków pod względem bogactwa allelicznego, heterozygotyczności obserwowanej (H_o) i spodziewanej (H_e), dystansu genetycznego F_{ST} i współczynnika spokrewnienia Rel (Hamilton 1971) przeprowadzono w programie Fstat (Goudet 1995 i 2001). Istotność statystyczną różnic oceniono na podstawie testu z 1000 permutacji. Porównania wykonano dla prób oryginalnych i dla prób po poprawce dla alleli zerowych oraz dla obu tych prób po usunięciu najmniej licznych kolonii (poniżej pięciu osobników). Dodatkowo w programie SPAGeDi (Hardy i Vekemans 2002) dla prób oryginalnych bez najmniej licznych kolonii oszacowano dystans genetyczny R_{ST} , współczynniki wsobności R_{IS} .

TEST NA IZOLACJĘ PRZEZ DYSTANS

Dla obu populacji przeprowadzono test Mantela w programie Fstat (Goudet 1995, 2001) sprawdzający, czy istnieje liniowa zależność między dystansem genetycznym a dystansem geograficznym. W przypadku izolacji przez dystans powinna istnieć dodatnia korelacja pomiędzy logarytmem dystansu geograficznego a zlinearyzowanym dystansem F_{ST} (Slatkin 1995) i R_{ST} (Slatkin 1995) oraz D_S Nei (Nei 1978). Test Mantela został przeprowadzony zarówno dla prób oryginalnych, jak i po poprawce dla alleli zerowych, ale tylko dla kolonii o większych liczebnościach (bez kolonii Słupski Młyn, Duninów i Krzyż Wielkopolski w przypadku karlika drobnego i bez kolonii Mylin w przypadku karlika malutkiego). Uznano, że zbyt niska liczebność nie daje miarodajnej oceny wariancji w obrębie kolonii i próby takie nie są równocenne w porównaniu z pozostałymi liczniejszymi, a przy porównaniu macierzy, tak właśnie byłyby traktowane. Dodatkowo przeprowadzono test Mantela dla populacji karlika malutkiego z wyłączeniem kolonii z Krzyża Wielkopolskiego — przyjęto, że była to kolonia zimowa, a jako taka różniła się etiologią od kolonii macierzystych, co mogło zaburzyć wyniki testu. Oceny istotności otrzymanych wyników dokonano na podstawie 10 000 permutacji.

ANALIZA PRZESTRZENNEJ AUTOKORELACJI

Analizę przestrzennej korelacji (Smouse i Peakall 1999) dla populacji obu gatunków przeprowadzono w programie GenAlEx 6.2 (Peakall i Smouse 2006). Analiza ta pokazuje korelację dystansu genetycznego z samym sobą jako funkcję odległości — istotne statystycznie wartości autokorelacji świadczą o nielosowej strukturze populacji. Populacje obu gatunków podzielono na cztery klasy odległości, przy czym aby uniknąć pustych klas, nie były one równe. I tak dla karlika malutkiego były to klasy : 0–100 km, >100–200 km, >200–350 km i >350–450 km; a dla karlika drobnego ostatnia klasa miała zakres do 500 km. Przedział ufności (95%) dla hipotezy zerowej o braku przestrzennej struktury (panmiksji) został określony na podstawie 999 permutacji (przedstawiony na wykresie, jako czerwone linie). Dodatkowo określony został 95% przedział ufności dla średnich wartości korelacji na podstawie metody *bootstrap*. Analizę przedstawiono tylko dla danych oryginalnych, bowiem wprowadzenie poprawek dla alleli zerowych nie wносиło znaczących zmian.

STRUKTURA POPULACJI — ANALIZA GŁÓWNYCH WSPÓLRZĘDNYCH

Do sprawdzenia zmienności dystansu genetycznego pomiędzy poszczególnymi osobnikami pozwalającej na wyodrębnienie podgrup w populacjach obu gatunków karlików, a także sprawdzenia rozdzielenia gatunków, wykorzystano analizę głównych współrzędnych (ang. *principal coordinate analysis*, PCoordA) z programu GenAlEx 6.2 (Peakall i Smouse 2006; modyfikacje: Beck i in. 2008, Smouse i in. 2008). Macierz dystansów genetycznych pomiędzy osobnikami zastosowana w analizie PCoordA została obliczona zgodnie z procedurą zaproponowaną w programie GenAlEx 6.2 dla danych kodominujących (Peakall i Smouse 2007, Peakall i in. 1995, Smouse i Peakall 1999). Wybrano opcję analizy PCoordA ze standaryzowaną macierzą kowariancji. Wyniki przedstawione zostały graficznie tylko dla pierwszych dwóch współrzędnych głównych, jako, że wykresy dla pozostałych współrzędnych nie wносиły nic nowego. Analizę przedstawiono tylko dla danych oryginalnych, bowiem wprowadzenie poprawek dla alleli zerowych nie wносиło istotnych zmian.

PODZIAŁ POPULACJI NA GRUPY — SAMOVA

Do badań podziału populacji badanych gatunków, a także, aby sprawdzić czy podział na gatunki okaże się najbardziej „naturalnym” z możliwych podziałów badanych kolonii (tzn. takim o największej wariancji między grupami, przy najniższej wariancji wewnątrzgrupowej) posłużono się programem SAMOVA 1.0 (Dupanloup i in. 2002). Program ten dokonuje symulacji podziałów na wybraną przez użytkownika liczbę grup i wykonując dla każdego układu analizę AMOVA (ang. *analysis of molecular variance*) znajduje taki podział, dla którego wielkość zróżnicowania genetycznego pomiędzy grupami jest największa. Dodatkowo SAMOVA (ang. *spatial analysis of molecular variance*) pozwala na identyfikację barier geograficznych dla przepływu genów.

Dla uzyskanych przez program najlepszych podziałów przeprowadzono analizę AMOVA w programie Arlequin (Excoffier i in. 2005), gdyż w porównaniu z tą wykonywaną przez program SAMOVA (Dupanloup i in. 2002) pozwala ona na wyodrębnienie jednego poziomu zmienności więcej; zamiast zmienności w obrębie subpopulacji (w tym przypadku kolonii) podaje zmienność między osobnikami w obrębie subpopulacji i między osobnikami. Przy badaniach struktury populacji odrzucono cztery najmniej liczne grupy: Nowy Duninów, Słupski Młyn, Mylin (liczące po dwa osobniki) oraz Krzyż Wielkopolski dla karlika drobnego

(jeden osobnik), gdyż uznano, że taka liczebność nie daje miarodajnej oceny wariacji i mogłaby zakłócić wyniki procedury. Analizę przedstawiono tylko dla danych oryginalnych, bowiem wprowadzenie poprawek dla alleli zerowych nie wносиło znaczących zmian.

MIGRACJA

Do oszacowania migracji zastosowano test przypisania oraz test na obecność migrantów pierwszego pokolenia z programu GeneClass2 2.0 (Piry i in. 2004). W obu przypadkach zastosowano metodę bayesowską — Ranalla i Mountain (1997) i algorytm Monte-Carlo wielokrotnego próbkowania — Paetkau i in. (2004) z 1000 symulacji i poziomem błędu pierwszego rodzaju równym 0,01.

Test przypisania (ang. *assignment test*) polegał na oszacowaniu prawdopodobieństwa, z jakim każdego osobnika z populacji można przypisać do danej kolonii, przy czym przy szacowaniu tego prawdopodobieństwa dla kolonii określonej jako rodzimej dla danego osobnika usuwany był on ze swojej populacji w trakcie obliczeń z zastosowaniem algorytmu „*leave-one-out*” (Efron 1983). Liczba takich wzajemnych przypisań między koloniami może być traktowana jako wskaźnik względnego tempa migracji pomiędzy nimi (Waser i Strobeck 1998). W teście na obecność migrantów z pierwszego pokolenia szacowane było prawdopodobieństwo, z jakim dany osobnik może zostać uznany za imigranta (przy poziomie istotności 0,001), i jednocześnie określona była najbardziej prawdopodobna kolonia źródłowa tego osobnika na podstawie wskaźnika podobieństwa takiego osobnika do osobników z innych kolonii. Wyniki analizy przypisania przedstawione zostały na dwa sposoby — jako bezwzględna liczba osobników oraz jako procent, jaki przypisane osobniki stanowią względem liczebności całej kolonii. Obliczenia przeprowadzone zostały na danych bez poprawionych alleli zerowych, ze względu na to, że dane po takiej korekcie nie nadają się do porównań indywidualnych, a jedynie do porównań uśrednionych dla całej populacji.

OSZACOWANIE EFEKTU „SZYJKI OD BUTELKI”

To, czy badane populacje lub też poszczególne kolonie wykazują cechy przejścia przez „szyjkę od butelki” sprawdzone zostało w programie Bottleneck (Cornuet i Luikart 1996). Za model mutacji badanych markerów przyjęto model mieszany (*two phase model*; TPM) między modelem nieskończonej liczby alleli

(ang. *infinite allele model*, IAM; Kimura i Crow 1964) a modelem stopniowych mutacji (ang. *stepwise mutation model*, SMM; Kimura i Ohta 1978). Model taki, według danych literaturowych, wydaje się najlepiej opisywać rzeczywiste zjawiska zachodzące w przypadku mutacji sekwencji mikrosatelitarnych (Di Rienzo i in. 1994). Posłużono się testami Wilcoxon'a o hipotezie zerowej zakładającej równowagę między mutacjami a dryfem (tempem powstawania mutacji a tempem ich usuwania z populacji) i hipotezami alternatywnymi o braku równowagi (test dwustronny), nadmiarze lub deficycie heterozygotyczności (testy jednostronne) obserwowanej w stosunku do spodziewanej dla obserwowanej liczby alleli przy przyjęciu mieszanego modelu mutacji (warto zauważyć, że nadmiar heterozygotyczności nie oznacza tutaj nadmiaru heterozygot w populacji w stosunku do równowagi H-W). W wynikach podane zostały jedynie wartości prawdopodobieństwa, z którym można odrzucić hipotezę zerową dla testu jednostronnego zakładającego jako hipotezę alternatywną nadmiar heterozygotyczności — bowiem nadmiar heterozygotyczności jest przy przyjętym modelu wskaźnikiem efektu „szyjki od butelki”. Dodatkowo posłużono się także testem na kształt krzywej przedstawiającej rozkład frekwencji alleli, która w warunkach równowagi pomiędzy dryfem a mutacjami powinna być L-kształtna. Przesunięcie kształtu takiej krzywej może stanowić dodatkowe potwierdzenie efektu „szyjki od butelki” (nie jest to jednak test statystyczny w klasycznym znaczeniu; nie ma dużej mocy i rekomendowany jest dla prób powyżej 30 osobników; Luikart i Cornuet 1998).

EFEKTYWNA WIELKOŚĆ POPULACJI

Ocena efektywnej wielkości populacji przeprowadzona została w programie NeEstimator (Peel i in. 2004). Oszacowanie wykonano za pomocą procedury opartej na nierównowadze sprzężeń (ang. *linkage/gametic disequilibrium*; Hill 1981) — wynik przedstawiony został jako oszacowanie efektywnej wielkości populacji wraz z 95% przedziałem ufności dla tego oszacowania. Efektywna wielkość populacji została oszacowana dla poszczególnych kolonii o liczebności większej niż pięć osobników i dla całych populacji badanych gatunków, zarówno dla prób oryginalnych i z odtworzonymi allelami zerowymi.

Dodatkowo przeprowadzono oszacowanie efektywnej wielkości populacji w programie *LDNE Version 1.31* (Waples i Do 2008). W programie tym również opartym na nierównowadze sprzężeń, czyli metodzie stworzonej przez Hilla (1981), ale z modyfikacją (korekcją błędu) wprowadzoną przez Waplesa (2006), możliwe jest

ustawienie dodatkowych parametrów dla oszacowania — wybór modelu rozmnażania (kojarzenie losowe kontra monogamia; wybrano kojarzenie losowe), jak również różne poziomy najniższych uwzględnianych frekwencji alleli (wybrano opcje 0,05, 0,02 i 0,01). Oszacowania przeprowadzono tylko dla prób oryginalnych ze względu na uzyskane bardzo zbliżone wartości dla prób oryginalnych i po poprawce dla alleli zerowych dla oszacowań przeprowadzonych w NeEstimator (Peel i in. 2004).

SPOKREWNIE

Średni współczynnik spokrewnienia (Queller i Goodnight 1989) dla całych populacji badanych gatunków oraz dla poszczególnych kolonii został wyznaczony w programie Relatedness 5.0 (Goodnight i Queller 2004). Błąd standardowy został obliczony na podstawie procedury „*jackknife over loci*” (Sokal i Rolf 1981). Zastosowano także poprawkę błędu dla frekwencji alleli, wynikającego z obecności krewnych w próbie (poszczególnych koloniach). Brak takiej poprawki mógłby prowadzić do niedoszacowania współczynnika spokrewnienia.

Sprawdzono także współczynnik korelacji (r Pearsona) pomiędzy średnim współczynnikiem spokrewnienia a współczynnikiem wsobności F_{IS} , aby wykluczyć wpływ sposobu pobierania próby z kolonii (część prób była pobierane w okresie, kiedy w koloniach znajdowały się już urodzone w danym roku młode) na zawyżenie oszacowanie F_{IS} . Testy wykonano w programie STATISTICA 7.1 (StatSoft, Inc. 2005).

Wyniki

ANALIZA BŁĘDÓW AMPLIFIKACJI

Dla obu gatunków nie stwierdzono oznak świadczących o niewielkich zmianach w wielkości amplifikujących się alleli w reakcji PCR (ang. *stuttering*), czy też błędów wynikających z mniejszej efektywności amplifikacji dłuższych alleli od krótszych. W przypadku analizy poszczególnych kolonii, zarówno karlika malutkiego (Tab. 3), jak i drobnego (Tab. 4), dla wszystkich loci oprócz locus Ppip02, zawsze w którejsz z badanych kolonii wykazana została jednak możliwość istnienia alleli zerowych. Allele zerowe nie zostały jedynie wykryte w koloniach o małej liczebności — tj. dla Siemysławic i Mylina dla karlika malutkiego oraz Nowego Duninowa i Słupskiego Młyna dla karlika drobnego.

Tabela 3. Liczba heterozygot z allelem zerowym w koloniach karlika malutkiego.

Kolonia	Locus							
	Ppip01	Ppip02	Ppip03	Ppip04	Ppip05	Ppip06	EF04	EF15
NOW								1
ŁYS	1		5	4			5	5
PRZ			5	4		7	1	5
STO				1		4	3	
KRZ	9		14	17		29	17	21

Tabela 4. Liczba heterozygot z allelem zerowym w koloniach karlika drobnego.

Kolonia	Locus							
	Ppip01	Ppip02	Ppip03	Ppip04	Ppip05	Ppip06	EF04	EF15
POD				1		1	2	
BIA				6		5	3	6
GOR				10		9		
LUB				2		5		1
KOS			2	5			7	
GRZ	4			12	1	2	11	
PIS	1					2	5	8

Żadne locus nie wykazywało możliwości istnienia alleli zerowych jednocześnie we wszystkich koloniach danego gatunku. Z tego też względu (jak i z powodów opisanych w rozdziale „Materiał i metody”) uznano, że choć istnienia alleli zerowych nie można odrzucić, to argumenty za ich istnieniem też nie są w pełni przekonujące.

W związku z powyższym w pracy użyto dwóch zestawów danych — dane oryginalne oraz dane z wprowadzonymi poprawkami dla frekwencji alleli uwzględniającymi allele zerowe.

NIERÓWNOWAGA SPRZĘŻEŃ

Nie stwierdzono nierównowagi sprzężenia u karlika malutkiego w koloniach Siemysławice oraz Mylin, natomiast dla pozostałych kolonii istotną statystycznie nierównowagę wykazano dla od dwóch do sześciu par loci na 28 możliwych sprzężonych par (Tab. 5).

Tabela 5. Pary sprzężonych loci w poszczególnych koloniach karlika malutkiego.*

Kolonia	Loci sprzężone z:						
	locus 1	locus 2	locus 3	locus 4	locus 5	locus 6	locus 7
NOW	4	5	7				
ŁYS	4		4			7	8
PRZ		4, 6		5-8			
STO				8	7		
KRZ		5		6			8

*Locus Ppip01–Ppip06 oznaczono skrótowo cyframi 1–6, locus EF04 jako 7, a EF15 jako 8.

W przypadku karlika drobnego nie stwierdzono nierównowagi sprzężenia w koloniach Słupski Młyn oraz Duninów. Istotną statystycznie nierównowagę sprzężeń zaobserwowano jednak dla pozostałych kolonii; wykazano ją dla od trzech do 14 par loci na 28 możliwych sprzężonych par (Tab. 6).

Tabela 6. Pary sprzężonych loci w poszczególnych koloniach karlika drobnego.*

Kolonia	Loci sprzężone z:						
	locus 1	locus 2	locus 3	locus 4	locus 5	locus 6	locus 7
POD			4	7, 8			8
BIA			4	7, 8			8
GOR	4, 7			5-8			
LUB	2-8	4, 6, 8	4-7				
KOS		4		7	7		
GRZ	4, 7			6, 7	6		8
PIS	3, 4		4	6			8

*Locus Ppip01–Ppip06 oznaczono skrótowo cyframi 1–6, locus EF04 jako 7, a EF15 jako 8.

RÓWNOWAGA HARDY'EGO-WEINBERGA

W populacji karlika malutkiego test na równowagę H-W dla obu statystyk (F_{IS} i F_{IT}) pokazał, że prawdopodobieństwo jej istnienia w populacji jest bardzo niewielkie ($p = 0,001$ dla wszystkich loci razem i w każdym pojedynczym locus, z wyjątkiem Ppip02, dla którego wartość p wynosiła 0,477 dla F_{IS} i 0,373 dla F_{IT}).

Dla populacji karlika drobnego wynik testu był bardzo zbliżony do tego dla karlika malutkiego — dla wszystkich loci $p = 0,001$ i jedynie dla Ppip02 wartość p była wyższa i wynosiła 0,138 dla F_{IS} oraz 0,048 dla F_{IT} .

RÓWNOWAGA HARDY'EGO-WEINBERGA PO POPRAWKACH DLA ALLELI ZEROWYCH

W populacji karlika malutkiego dla wszystkich loci wziętych razem prawdopodobieństwo istnienia równowagi H-W było tak samo niskie ($p = 0,001$) jak bez poprawek dla alleli zerowych, jakkolwiek dla poszczególnych loci wartości p były nieco bardziej zróżnicowane i dla dwóch loci były nieco wyższe (wynosiły 0,023 i 0,002 dla Ppip01 oraz 0,015 i 0,005 dla Ppip03). Nadal wyjątek stanowiło locus Ppip02, dla którego p wynosiło, odpowiednio dla F_{IS} i F_{IT} , 0,469 i 0,389.

W populacji karlika drobnego wprowadzenie poprawek dla alleli zerowych w żaden sposób nie wpłynęło na wyniki testu.

RÓWNOWAGA HARDY'EGO-WEINBERGA Z HIPOTEZĄ ALTERNATYWNA O DEFICYCIE LUB NADMIARZE HETEROZYGOT

W przypadku karlika malutkiego dla wszystkich poszczególnych loci oraz populacji, wartości p dla testu na nadmiar heterozygot były bardzo wysokie i wahały się od 0,9 do 1, co definitywnie nie pozwala na przyjęcie hipotezy alternatywnej o nadmiarze heterozygot. Wprowadzenie poprawek uwzględniających allele zerowe nie wpływało na wyniki testu. W obu przypadkach dla wszystkich loci i populacji razem $p = 1$ z błędem standardowym dla iteracji 0,0000.

Natomiast w teście zakładającym deficyt heterozygot wszystkie loci z wyjątkiem Ppip02 ($p = 0,165$; błąd standardowy iteracji 0,015) charakteryzowały się odchyleniem od równowagi H-W w kierunku deficytu heterozygot dla większości loci z $p = 0,000$ i błędem 0,000, a dla Ppip05 z $p = 0,008$ i błędem 0,003. Dla wszystkich loci razem $p = 0,000$ z błędem standardowym dla iteracji 0,000. Dla próby z poprawką dla alleli

zerowych wyniki były takie same i tylko dla Ppip01 i Ppip05 wartość p wynosiła 0,002 z błędem 0,001.

Cztery kolonie karlika malutkiego, tj. Łysomice, Przeworno, Stolec i Krzyż Wielkopolski, wykazywały odchylenie od równowagi H-W w kierunku deficytu heterozygot z $p = 0,000$ i błędem standardowym iteracji 0,000; z kolei dla kolonii Nowolesie $p = 0,005$ (z błędem 0,002). Natomiast dla dwóch, zresztą najmniej licznych kolonii nie można było odrzucić hipotezy o równowadze H-W: Siemysławice ($p = 0,257$, błąd 0,005) oraz Mylin ($p = 0,085$, błąd 0,002). Wyniki dla próby z poprawką dla alleli zerowych były bardzo zbliżone, tylko dla kolonii z Nowolesia nieco różniła się wartość p — 0,002 (z błędem 0,001). Pozostałe różnice pojawiały się dopiero na czwartym miejscu po przecinku.

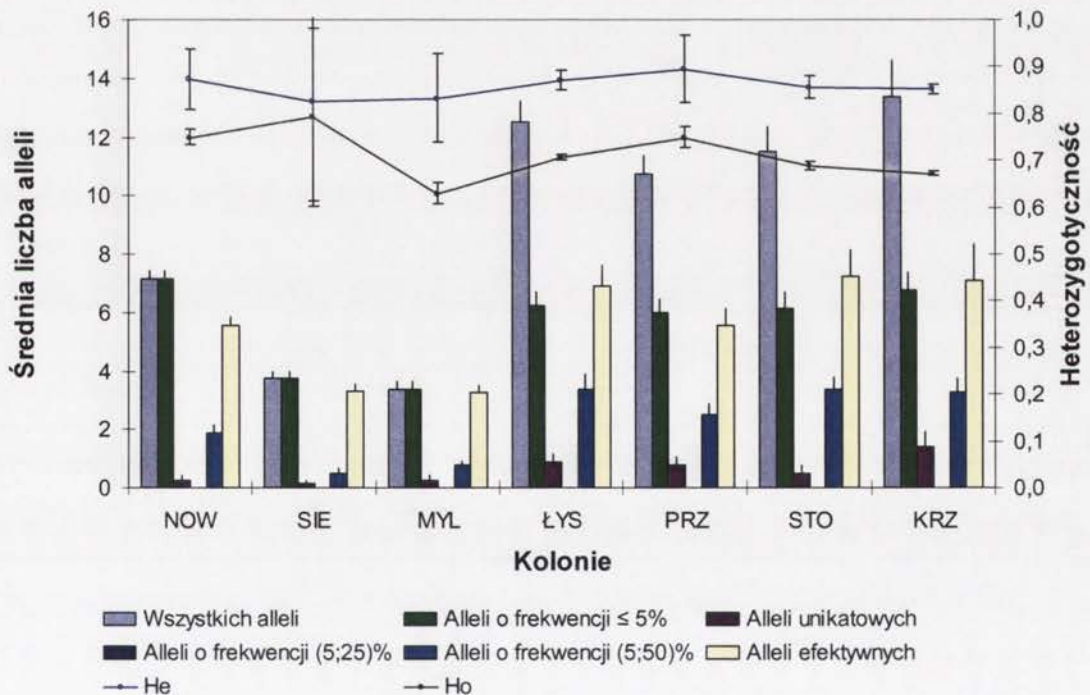
W przypadku karlika drobnego test na nadmiar heterozygot dał analogiczne wyniki, jak w przypadku karlika malutkiego — hipoteza o odchyleniu od równowagi H-W w kierunku nadmiaru heterozygot była nie do przyjęcia zarówno dla prób oryginalnych, jak i z poprawką dla alleli zerowych.

Wszystkie loci charakteryzowały się deficytem heterozygot z $p = 0,000$ i błędem standardowym dla iteracji 0,000, z wyjątkiem Ppip02, dla którego wartość p była nieco wyższa, $p = 0,030$ z błędem 0,005, ale również na przyjętym poziomie istotności. Dla wszystkich loci razem $p = 0,000$ z błędem standardowym dla iteracji 0,000. Dla wszystkich kolonii również stwierdzono istotne statystycznie odchylenie od równowagi H-W w kierunku deficytu heterozygot z $p = 0,000$ i z błędem standardowym dla iteracji 0,000; tylko dla dwóch najmniej licznych kolonii wartość p była nieco wyższa: w przypadku Słupskiego Młyna $p = 0,028$ (błąd 0,001), a dla Nowego Duninowa 0,039 (0,001). Dla prób z wprowadzonymi poprawkami dla alleli zerowych wyniki różniły się co najwyżej na poziomie czwartego miejsca po przecinku.

PODSTAWOWE STATYSTYKI

U karlika malutkiego średnia liczba wszystkich alleli mieściła się w przedziale 3,3–13,4, przy czym po odrzuceniu wyników dla dwóch najmniej licznych kolonii (Siemysławice i Mylin; średnia liczba alleli odpowiednio: 3,7 i 3,3) zakres przedziału wynosił 7,1–13,4. Największa średnia liczba alleli odnotowana została w kolonii z Krzyża Wielkopolskiego, a druga z kolei dla kolonii z Łysomic — 12,5 (Ryc. 3). Kolonie te miały też jedne z najwyższych wartości efektywnej liczby alleli — 7,1

w przypadku Krzyża Wielkopolskiego i 6,9 w przypadku Łysomic. Najwyższą liczbę efektywnych alleli miała kolonia ze Stolca — 7,3. Kolonia ta miała też największe bogactwo alleliczne (3,38), przy czym jego wartość była podobna dla wszystkich kolonii (najniższa dla Siemistawic — 3,03; Tab. 7). Średnia liczba alleli rzadkich (o frekwencji populacji poniżej 5%) była taka sama, jak średnia liczba wszystkich alleli dla kolonii z Nowolesia, Siemistawic i Mylina, a dla pozostałych kolonii zawierała się w przedziale od 6,0 do 7,1, co stanowiło z reguły nieco ponad połowę liczby wszystkich alleli. Alleli o frekwencji w populacji między 5% a 25% w ogóle nie odnotowano, natomiast liczba alleli o frekwencji z zakresu 5%–50% dla kolonii z wyłączeniem dwóch najmniej licznych mieściła się w przedziale 1,9–3,4 (Siemistawice — 0,5; Mylin — 0,8).



Rycina 3. Średnia liczba wszystkich alleli, alleli unikatowych i efektywnych, alleli o frekwencjach w populacji: $\leq 5\%$, $(5;25)\%$, $(5;50)\%$; oraz heterozygotyczność oczekiwana (H_e) i obserwowana (H_o) w koloniach karlika malutkiego.

Średnia liczba alleli unikatowych była najwyższa dla kolonii z Krzyża Wielkopolskiego, a stosunkowo wysoka w koloniach z Łysomic i Przeworna (0,8 w obu przypadkach) i mieściła się w zakresie 0,1–1,4 (Tab.7). Najwięcej osobników z jednym lub wieloma allelami unikatowymi pochodziło z kolonii z Krzyża Wielkopolskiego — 16 osobników; stosunkowo dużo, bo sześć takich osobników było w kolonii z Łysomic, a pięć stwierdzono w kolonii z Przeworna.

Współczynnik wsobności F_{IS} przyjmował dla wszystkich kolonii wartości dodatnie i zawierał się w przedziale od 0,05 (Siemysławice) do 0,25 (Łysomice), a dla prób po korekcie dla alleli zerowych między 0,01 (Krzyż Wielkopolski) a 0,15 (Przeworno). Heterozygotyczność obserwowana mieściła się w zakresie od 0,63 (Mylin) do 0,79 (Siemysławice), a oczekiwana w zakresie od 0,83 (Mylin i Siemysławice) do 0,90 (Przeworno). Heterozygotyczność obserwowana była we wszystkich koloniach niższa od oczekiwanej (istotnie statystycznie, $p \leq 0,005$, dla wszystkich kolonii oprócz Siemysławic i Mylina). Zaobserwowana różnica była najmniejsza dla kolonii z Siemysławic (0,03) a największa dla kolonii z Mylina (0,20), dla reszty kolonii zawierała się w przedziale 0,12–0,18. Heterozygotyczność obserwowana dla próby z uwzględnionymi poprawkami dla alleli zerowych (bez kolonii z Mylina i Siemysławic, bo tam takich alleli nie stwierdzono) dla wszystkich kolonii była bardzo zbliżona i wynosiła 0,86 dla kolonii z Przeworna, 0,87 dla kolonii z Krzyża Wielkopolskiego i 0,88 dla pozostałych kolonii. Heterozygotyczność obserwowana zawierała się w zakresie między 0,73 dla kolonii Łysomic do 0,80 dla kolonii z Krzyża Wielkopolskiego. Była więc nieco wyższa niż w przypadku prób oryginalnych, ale nadal heterozygotyczność obserwowana była istotnie niższa od oczekiwanej, a różnica między nimi zawierała się w zakresie 0,07 (Krzyż Wielkopolski) do 0,15 (Łysomice).

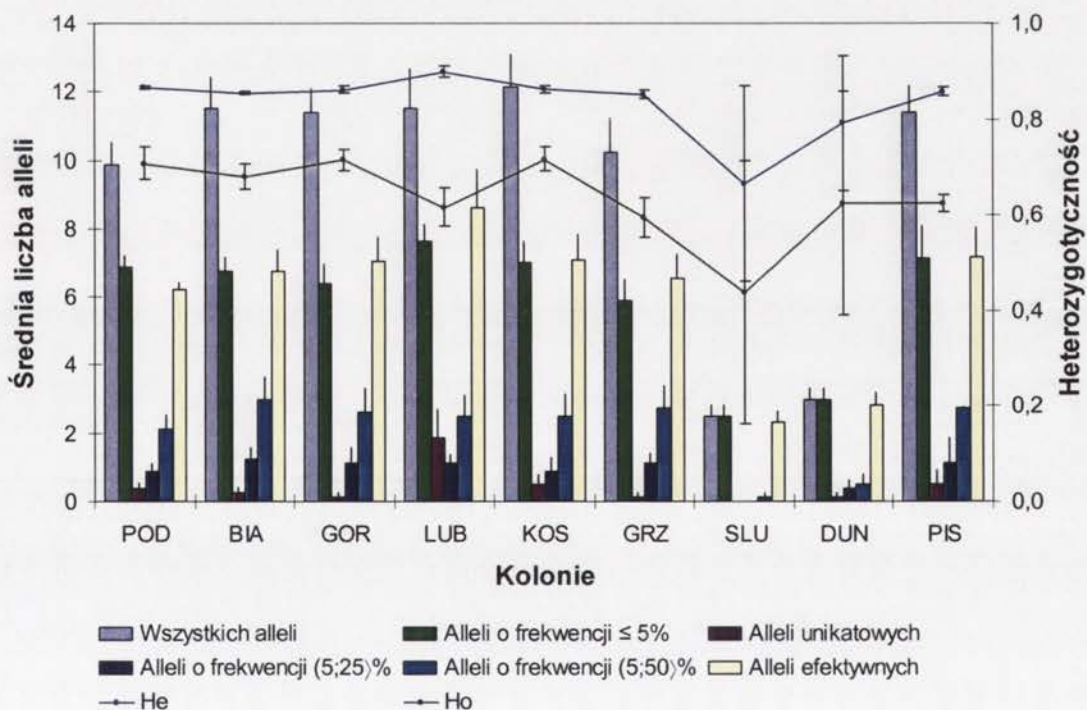
Tabela 7. Efektywna liczba alleli, bogactwo alleliczne (dla minimalnej grupy dwóch osobników), liczba osobników z jednym lub wieloma allelami unikatowymi oraz współczynnik wsobności F_{IS} dla prób oryginalnych i z poprawkami dla alleli zerowych (na czerwono zaznaczono wartości F_{IS} istotne na poziomie 5%) dla kolonii karlika malutkiego.

Parametr	Kolonia						
	NOW	SIE	MYL	ŁYS	PRZ	STO	KRZ
Bogactwo alleliczne	3,32	3,03	3,26	3,15	3,32	3,38	3,23
Liczba osobników z allelami unikatowymi	2	1	1	6	5	4	16
F_{IS}	0,15	0,05	0,23	0,25	0,20	0,20	0,21
F_{IS} (po poprawce dla alleli zerowych)	0,14			0,14	0,15	0,13	0,01

U karlika drobnego średnia liczba wszystkich alleli mieściła się w przedziale 2,5–12,1, przy czym po odrzuceniu wyników dla dwóch najmniej licznych kolonii (Duninów i Słupski Młyn) zakres ten mieścił się między 9,6 a 12,1 (Ryc. 4). Największa średnia liczba alleli została zaobserwowana w kolonii z Górek Kościelnych. Z kolei największa efektywna liczba alleli została stwierdzona w kolonii z Lubni (8,6),

dla pozostałych kolonii zawierała się w zakresie 6,5–7,2 i tylko dla Słupskiego Młyna oraz Duninowa była niższa, odpowiednio 2,5 i 2,8. Bogactwo alleliczne zawierało się w przedziale pomiędzy 2,50 (Słupski Młyn) a 3,45 (Lubnia), przy czym dla większości kolonii było zbliżone do wartości 3,2 (Tab. 8).

Średnia liczba alleli rzadkich (o frekwencji $\leq 5\%$) oraz alleli pospolitych o frekwencjach z przedziałów (5; 25) % i (5;50) % była zbliżona dla wszystkich kolonii z wyjątkiem dwóch najmniej licznych. I tak dla kolonii z wyłączeniem kolonii ze Słupskiego Młyna i Duninowa mieściły się one odpowiednio w przedziałach: 5,9–7,6, 0,9–1,3 oraz 2,1–3,0. Natomiast dla Słupskiego Młyna i Duninowa wszystkie te wartości znajdowały się w przedziale 0–0,5.



Rycina 4. Średnia liczba wszystkich alleli, alleli unikatowych i efektywnych, alleli o frekwencjach: $\leq 5\%$, (5;25)%, (5;50)%; oraz heterozygotyczność oczekiwana (He) i obserwowana (Ho) w koloniach karlika drobnego.

Największa liczba alleli unikatowych obecna była w kolonii z Lubni (1,9), ich liczba była też stosunkowo wysoka dla kolonii z Jeziora Piscoznego i kolonii z Górek Kościelnych (0,5 w obu przypadkach), natomiast nie było ich wcale w kolonii ze Słupskiego Młyna. Liczba osobników z allelami unikatowymi była także największa w Lubni i wynosiła 8 osobników (Tab. 8). Po trzy osobniki z allelami unikatowymi

odnotowano w koloniach z: Poddębja, Górek Kościelnych oraz znad Jeziora Pisocznego. Współczynnik wsobności F_{IS} przyjmował dla wszystkich kolonii wartości dodatnie i zawierał się w przedziale od 0,17 (Górki i Górki Kościelne) do 0,44 (Słupski Młyn), a po poprawce dla alleli zerowych w przedziale 0,09 (Górki) do 0,25 (Lubnia). Heterozygotyczność obserwowana mieściła się w zakresie od 0,44 (Słupski Młyn) do 0,72 (Górki Kościelne), a oczekiwana w zakresie od 0,67 (Słupski Młyn) do 0,90 (Lubnia). Heterozygotyczność obserwowana była we wszystkich koloniach niższa od oczekiwanej ($p < 0,05$). Różnica była najmniejsza dla kolonii z Górek i Górek Kościelnych (0,15) a największa dla kolonii z Lubni (0,28). Dla prób z poprawką dla alleli zerowych wartość oczekiwana heterozygotyczności zmieniła się bardzo nieznacznie o wartość maksymalnie 0,02 (dla Lubni 0,92), natomiast górna granica dla heterozygotyczności obserwowanej wzrosła do 0,79 (Górki), a przedział różnic między heterozygotycznością obserwowaną a oczekiwaną zmienił się na 0,08–0,25 (najmniejsza różnica dla kolonii z Górek a największa już nie dla kolonii z Lubni (0,21), ale dla kolonii ze Słupskiego Młyna). Nie było znaczących zmian w wartości p dla porównań.

Tabela 8. Efektywna liczba alleli, bogactwo alleliczne (dla minimalnej grupy dwóch osobników), liczba osobników z jednym lub wieloma allelami unikatowymi oraz współczynnik wsobności F_{IS} dla prób oryginalnych i z poprawkami dla alleli zerowych (na czerwono zaznaczono wartości F_{IS} istotne na poziomie 5%) dla kolonii karlika drobnego.

Parametr	Kolonia								
	POD	BIA	GOR	LUB	KOS	GRZ	SLU	DUN	PIS
Bogactwo alleliczne	3,29	3,24	3,27	3,45	3,28	3,22	2,50	3,00	3,26
Liczba osobników z allelami unikatowymi	3	2	1	8	3	1		1	3
F_{IS}	0,19	0,21	0,17	0,32	0,17	0,31	0,44	0,29	0,28
F_{IS} (po poprawce dla alleli zerowych)	0,16	0,12	0,09	0,25	0,12	0,16			0,20

Pod względem średniej liczby alleli gatunki różniły się między sobą w sposób istotny statystycznie przede wszystkim w przypadku alleli o frekwencji większej niż 5%, ale mniejszej niż 25% — allele takie w ogóle nie były obecne u karlika malutkiego (test Manna-Whitneya $U = 3,5$, $p = 0,003$). Z kolei u karlika drobnego przeciętnie w poszczególnych koloniach niższa była średnia liczba alleli unikatowych (średnia dla wszystkich kolonii to 0,43 versus 0,59 lub 0,46 po usunięciu kolonii zimowej z Krzyża Wielkopolskiego), podobnie odnotowano mniejszą liczbę osobników o allelach

unikatowych (średnia dla wszystkich kolonii 2,8 versus 5,0 lub 3,2 bez kolonii z Krzyża Wielkopolskiego), przy czym średnie te nie odbiegają od siebie w sposób istotny statystycznie.

ZRÓŻNICOWANIE POPULACJI

Kolonie karlika malutkiego cechowało statystycznie istotne zróżnicowanie pod względem frekwencji alleli (test na zróżnicowanie; Goudet i in. 1996) zarówno dla prób oryginalnych, jak i dla tych z odtworzonymi allelami zerowymi (odpowiednio: $p = 0,001$ i $p \ll 0,001$). Dla porównań parami prób oryginalnych (z poprawką Bonferoniego dla wielokrotnych porównań) pod względem frekwencji alleli kolonia z Krzyża Wielkopolskiego istotnie różniła się od kolonii z Przeworna, Stolca i Łysomic. Natomiast kolonie z Przeworna i Stolca różniły się istotnie od kolonii z Łysomic (Tab. 9). Po wprowadzeniu korekty dla alleli zerowych znaczącej zmianie uległy dwa porównania — różnica między kolonią ze Stolca i Łysomic przestała być istotna, natomiast różnica między Krzyżem Wielkopolskim a Mylinem zyskała 5% poziom istotności (Tab. 9; prawa górna połowa).

Tabela 9. Wartości p dla testu na zróżnicowanie populacji (przy czym 0,001 to po poprawce poziom istotności 5%; wyniki istotne statystycznie zaznaczono na czerwono). Lewa dolna część tabeli to wyniki dla prób oryginalnych, a prawa górna dla prób po poprawce dla alleli zerowych.

Kolonia	NOW	SIE	ŁYS	PRZ	STO	MYL	KRZ
NOW		0,298	0,005	0,238	0,033	0,179	0,014
SIE	0,200		0,317	0,405	0,938	0,112	0,179
ŁYS	0,007	0,357		0,002	0,005	0,005	0,002
PRZ	0,295	0,512	0,002		0,012	0,017	0,002
STO	0,036	0,952	0,002	0,026		0,174	0,002
MYL	0,176	0,105	0,017	0,017	0,143		0,002
KRZ	0,024	0,321	0,002	0,002	0,002	0,005	

Kolonie karlika drobnego cechowało istotne zróżnicowanie pod względem frekwencji alleli zarówno dla prób oryginalnych ($p = 0,001$), jak i z odtworzonymi allelami zerowymi ($p \ll 0,001$). Dla porównań parami prób oryginalnych (z poprawką Bonferoniego dla wielokrotnych porównań) kolonia z Lubni różniła się istotnie od wszystkich pozostałych kolonii z wyjątkiem trzech: Poddębna, Słupskiego Młyna oraz Duninowa (Tab. 10). Po wprowadzeniu poprawki dla alleli zerowych wyniki nie uległy znaczącej zmianie.

Tabela 10. Wartości p dla testu na zróżnicowanie populacji (przy czym 0,001 to po poprawce poziom istotności 5%; wyniki istotne statystycznie zaznaczono na czerwono). Lewa dolna część tabeli to wyniki dla prób oryginalnych, a prawa górna dla prób po poprawce dla alleli zerowych.

Kolonia	POD	BIA	GOR	LUB	KOS	GRZ	SŁU	DUN	PIS
POD		0,372	0,149	0,314	0,402	0,058	0,432	0,407	0,017
BIA	0,383		0,122	0,001	0,130	0,051	0,521	0,236	0,131
GOR	0,266	0,322		0,001	0,014	0,004	0,407	0,160	0,010
LUB	0,182	0,001	0,001		0,001	0,001	0,618	0,232	0,001
KOS	0,386	0,289	0,162	0,001		0,093	0,827	0,371	0,118
GRZ	0,108	0,172	0,050	0,001	0,164		0,680	0,184	0,022
SŁU	0,389	0,596	0,524	0,653	0,844	0,878		0,689	0,966
DUN	0,371	0,269	0,232	0,244	0,340	0,302	0,652		0,259
PIS	0,021	0,112	0,290	0,001	0,390	0,112	0,981	0,287	

DYSTANS GENETYCZNY

Dystans genetyczny oszacowany (bez poprawki dla alleli zerowych) na podstawie wskaźnika F_{ST} pomiędzy koloniami karlika malutkiego był stosunkowo niski i zawierał się w przedziale od -0,005 do 0,070 (Tab. 11). Najniższy dystans genetyczny zaobserwowano dla pary kolonii Siemysławice i Stolec, a największy dla kolonii Przeworno i Mylin, przy czym oba wyniki nie były istotne statystycznie. Znaczący statystycznie dystans genetyczny stwierdzono pomiędzy kolonią ze Stolca a koloniami z Nowolesia, Przeworna, Łysomic i Krzyża Wielkopolskiego. Wartości dystansu były zbliżone i zawierały się w przedziale 0,012 (Krzyż Wielkopolski) do 0,027 (Nowolesie). Ponadto istotny dystans genetyczny wykazano pomiędzy kolonią z Przeworna i Łysomic (0,022) oraz między tymi dwoma koloniami a kolonią z Krzyża Wielkopolskiego (odpowiednio: 0,018 i 0,024). Wyniki dla prób z poprawką dla alleli zerowych były bardzo zbliżone (różnice w wartościach F_{ST} plasowały się na trzecim miejscu po przecinku) z tą różnicą, że dystans między koloniami z Nowolesia i Stolca nie był istotny statystycznie.

Tabela 11. Dystans genetyczny F_{ST} pomiędzy koloniami karlika malutkiego (wyniki istotne statystycznie zaznaczono na czerwono). Lewa dolna część tabeli to wyniki dla prób oryginalnych, a prawa górna dla prób po poprawce dla alleli zerowych.

Kolonia	NOW	SIE	ŁYS	PRZ	STO	MYL	KRZ
NOW		0,036	0,017	0,013	0,020	0,027	0,014
SIE	0,038		0,020	0,023	0,005	0,071	0,018
ŁYS	0,018	0,022		0,017	0,011	0,044	0,015
PRZ	0,015	0,019	0,022		0,014	0,061	0,018
STO	0,027	-0,005	0,015	0,021		0,022	0,008
MYL	0,031	0,044	0,045	0,070	0,023		0,057
KRZ	0,015	0,013	0,018	0,024	0,012	0,061	

U karlika drobnego wartość wskaźnika F_{ST} dla poszczególnych par kolonii mieściła się w przedziale od -0,000 do 0,167 (Tab. 12). Najniższą wartość zanotowano pomiędzy kolonią z Górek a kolonią znad Jeziora Pisocnego, a najwyższą między kolonią ze Słupskiego Młyna a kolonią z Duninowa, ale wyniki te nie były istotne statystycznie. Istotnie statystycznie wartości F_{ST} stwierdzono pomiędzy kolonią z Lubni a koloniami: z Białowieży, Gaj-Grzmiący, Górek Kościelnych i znad Jeziora Pisocnego oraz pomiędzy kolonią z Górek a kolonią z Białowieży i między kolonią z Poddębna a kolonią znad Jeziora Pisocnego. W tych przypadkach dystans mieścił się w zakresie 0,007–0,032. Dla prób po poprawce dla alleli zerowych wartości dystansu F_{ST} , podobnie jak u karlika malutkiego, różniły się nieznacznie, natomiast więcej było par kolonii, dla których wartość dystansu osiągała poziom istotny statystycznie. I tak, dodatkowo w porównaniu z próbami oryginalnymi, istotny był dystans między kolonią z Poddębna a koloniami z Górek oraz Gaj-Grzmiący; między Białowieżą a Gaj-Grzmiącą oraz między Lubnią a Górkami. Z kolei w odróżnieniu od prób oryginalnych dystans między Górkami a Białowieżą nie był istotny. Istotnie statystycznie wartości dystansu mieściły się w przedziale 0,011–0,024.

Tabela 12. Dystans genetyczny F_{ST} pomiędzy koloniami karlika drobnego (na czerwono zaznaczono wyniki istotne statystycznie). Lewa dolna część tabeli to wyniki dla prób oryginalnych, a prawa górna dla prób po poprawce dla alleli zerowych.

Kolonia	POD	BIA	GOR	LUB	KOS	GRZ	SŁU	DUN	PIS
POD		0,007	0,011	0,006	0,007	0,014	0,071	0,047	0,023
BIA	0,010		0,006	0,021	0,001	0,011	0,056	0,060	0,007
GOR	0,011	0,007		0,023	0,001	0,008	0,044	0,060	0,004
LUB	0,013	0,031	0,027		0,016	0,021	0,073	0,074	0,024
KOS	0,009	0,003	0,001	0,023		0,004	0,030	0,040	0,001
GRZ	0,012	0,011	0,007	0,028	0,006		0,052	0,043	0,010
SŁU	0,080	0,057	0,046	0,079	0,032	0,047		0,170	0,032
DUN	0,050	0,057	0,057	0,070	0,043	0,034	0,167		0,060
PIS	0,022	0,009	-0,000	0,032	0,001	0,010	0,027	0,056	

W przypadku dystansu genetycznego wyznaczonego na podstawie współczynnika R_{ST} , uwzględniającego różnice w długości badanych sekwencji mikrosatelitarnych, zakres wartości obserwowanych dystansów był szerszy niż dla F_{ST} — od -0,005 do 0,203, ale tylko dla dwóch par kolonii wyniki były istotne — dla kolonii z Nowolesia i Stolca (w przypadku F_{ST} dla prób oryginalnych też był to najwyższy istotny dystans) oraz dla kolonii z Mylina i Krzyża Wielkopolskiego (Tab. 13).

Tabela 13. Dystans genetyczny R_{ST} pomiędzy koloniami karlika malutkiego (na czerwono zaznaczono wyniki istotne statystycznie).

Kolonia	NOW	SIE	ŁYS	PRZ	STO	MYL
SIE	-0,005					
ŁYS	0,050	-0,046				
PRZ	0,067	-0,040	0,001			
STO	0,106	-0,001	-0,007	0,003		
MYL	0,139	0,276	0,157	0,187	0,187	
KRZ	0,062	-0,013	-0,006	0,019	0,004	0,203

W populacji karlika drobnego kolonia z Lubni różniła się istotnie i na podobnym poziomie (między 0,11 a 0,17) od wszystkich kolonii z wyjątkiem dwóch najmniej licznych: Nowego Duninowa, Słupskiego Młyna (Tab. 14). Były to również najwyższe z obserwowanych dystansów, a najbardziej odległa od Lubni była kolonia znad Jeziora Pisocnego. Ponadto uzyskane wartości dystansu genetycznego były istotne między kolonią z Górek, a koloniami z Gaj-Grzmiący i znad Jeziora Pisocnego, przy czym wielkości dystansu były w tym przypadku niższe, odpowiednio: 0,05 i 0,03.

Tabela 14. Dystans genetyczny R_{ST} pomiędzy koloniami karlika drobnego (na czerwono zaznaczono wyniki istotne statystycznie).

Kolonia	POD	BIA	GOR	LUB	KOS	GRZ	SŁU	DUN
BIA	0,005							
GOR	0,011	-0,003						
LUB	0,126	0,107	0,135					
KOS	-0,012	0,001	0,007	0,143				
GRZ	0,032	0,023	0,050	0,128	0,032			
SŁU	-0,063	-0,090	-0,078	-0,047	-0,063	-0,036		
DUN	0,019	0,008	0,044	0,035	-0,008	-0,080	0,022	
PIS	-0,001	0,019	0,027	0,170	0,011	0,020	-0,084	0,012

W przypadku dystansu genetycznego między kolonią z Lubni a pozostałymi koloniami zarówno współczynnik F_{ST} , jak i R_{ST} dały podobne wyniki. Dla R_{ST} były to najwyższe dystanse, a dla F_{ST} jedne z najwyższych i najwyższe spośród istotnych statystycznie.

Sprawdzono korelację pomiędzy wartościami dystansu genetycznego ocenionego na podstawie wskaźnika F_{ST} i R_{ST} . W przypadku karlika malutkiego stwierdzono istotną dodatnią korelację pomiędzy tymi wskaźnikami — współczynnik korelacji wynosił 0,70 (test Mantela, $p = 0,04$). Natomiast dla karlika drobnego takiej korelacji nie stwierdzono ($p = 0,96$). Niemniej jednak po usunięciu z analiz dwóch najmniej licznych kolonii uzyskano podobną, jak u karlika malutkiego, wartość

współczynnika korelacji 0,77, a wynik ten był zbliżony do przyjętego poziomu istotności $p = 0,067$.

Największy dystans Nei, D_S Nei (Nei 1978) wśród kolonii karlika malutkiego oddzielał kolonię z Mylina od kolonii z Przeworna i Krzyża Wielkopolskiego ($\sim 0,5$ zarówno dla prób oryginalnych jak i z poprawkami dla alleli zerowych; Tab. 15), nieco mniejszy, ale stosunkowo wysoki od Łysomic, Siemysławic i Nowolesia ($\sim 0,3$ zarówno dla prób oryginalnych, jak i z poprawkami dla alleli zerowych). Dla obu zestawów danych dystans Nei przyjmował wartości z zakresu 0,2–0,3 między kolonią z Nowolesia a koloniami z Siemysławic, Stolca i Mylina. W przypadku pozostałych par kolonii wartości dystansu były niższe niż 0,2, a najmniejszy dystans dzielił kolonie ze Stolca i Siemysławic ($-0,02$ i $-0,01$ po poprawce dla alleli zerowych).

Tabela 15. Dystans genetyczny Nei (D_S Nei), pomiędzy koloniami karlika malutkiego. Lewa dolna część tabeli to wyniki dla prób oryginalnych, a prawa górna dla prób po poprawce dla alleli zerowych.

Kolonia	NOW	SIE	LYS	PRZ	STO	MYL	KRZ
NOW		0,233	0,122	0,077	0,184	0,248	0,101
SIE	0,261		0,143	0,117	-0,010	0,259	0,112
LYS	0,120	0,144		0,117	0,082	0,345	0,111
PRZ	0,077	0,105	0,126		0,097	0,491	0,126
STO	0,211	-0,021	0,100	0,119		0,176	0,063
MYL	0,251	0,259	0,333	0,499	0,158		0,496
KRZ	0,091	0,082	0,113	0,138	0,073	0,493	

U karlika drobnego wartości D_S Nei między koloniami mieściły się w zakresie pomiędzy $-0,001$ (Górki i J. Pisocne) do $0,75$ (Słupski Młyn a Nowy Duninów; Tab. 16). Największe dystanse dzieliły najbardziej odległe od siebie kolonie od pozostałych kolonii — dla Słupskiego Młyna wartości dystansu mieściły się w przedziale $(0,15-0,46)$, a dla Duninowa $(0,22-0,65)$. Dystans powyżej $0,20$ dzielił kolonie z Lubni od wszystkich kolonii z wyjątkiem Poddębna i Górek Kościelnych.

Tabela 16. Dystans genetyczny Nei (D_S Nei) pomiędzy koloniami karlika drobnego. Lewa dolna część tabeli to wyniki dla prób oryginalnych, a prawa górna dla prób po poprawce dla alleli zerowych.

Kolonia	POD	BIA	GOR	LUB	KOS	GRZ	SŁU	DUN	PIS
POD		0,054	0,070	0,037	0,038	0,083	0,414	0,310	0,147
BIA	0,062		0,044	0,185	0,009	0,080	0,301	0,393	0,044
GOR	0,070	0,044		0,181	0,010	0,047	0,236	0,421	0,021
LUB	0,096	0,235	0,208		0,133	0,144	0,487	0,614	0,210
KOS	0,058	0,017	0,004	0,177		0,024	0,172	0,282	0,010
GRZ	0,078	0,070	0,040	0,202	0,033		0,281	0,261	0,071
SŁU	0,429	0,285	0,225	0,457	0,153	0,223		0,746	0,158
DUN	0,340	0,394	0,404	0,655	0,297	0,216	0,746		0,380
PIS	0,153	0,058	-0,001	0,253	0,006	0,059	0,129	0,390	

PORÓWNANIE GATUNKÓW

Badane populacje karlika malutkiego i karlika drobnego cechuje bardzo zbliżony poziom wartości bogactwa allelicznego, heterozygotyczności obserwowanej i spodziewanej — w obu przypadkach mamy do czynienia z istotnym statystycznie deficytem heterozygotyczności (H_o jest niższe o około 0,2 od H_e). Karlik malutki miał wyższy współczynnik wsobności (F_{IS}) i dwukrotnie niższy wskaźnik dystansu genetycznego F_{ST} , ale różnice między gatunkami nie była istotna statystycznie (Tab. 17).

Tabela 17. Wskaźniki bogactwa allelicznego, heterozygotyczności, poziomu wsobności i spokrewnienia oraz F_{ST} — porównanie gatunków na podstawie 1000 permutacji dla prób oryginalnych.

Gatunek	Bogactwo alleliczne	H_o	H_e	F_{IS}	F_{ST}	Rel
Karlik drobny	1,827	0,679	0,866	0,230	0,007	0,011
Karlik malutki	1,859	0,666	0,857	0,208	0,014	0,023
p dla różnic międzygatunkowych	0,291	0,618	0,333	0,405	0,473	0,454

Porównanie gatunków z uwzględnieniem tylko kolonii o liczebności większej niż pięć osobników wpłynęło przede wszystkim na zmianę wartości oszacowania dla F_{ST} , F_{IS} i Rel dla populacji karlika drobnego (Tab. 18).

Tabela 18. Wskaźniki bogactwa allelicznego, heterozygotyczności, poziomu wsobności i spokrewnienia oraz F_{ST} — porównanie gatunków na podstawie 1000 permutacji dla kolonii o próbie większej niż pięć.

Gatunek	Bogactwo alleliczne	Ho	He	F_{IS}	F_{ST}	Rel
Karlik drobny	1,860	0,684	0,863	0,207	0,003	0,004
Karlik malutki	1,852	0,675	0,857	0,208	0,014	0,022
p dla różnic międzygatunkowych	0,853	0,829	0,568	0,974	0,519	0,504

Porównanie gatunków z uwzględnieniem poprawki dla alleli zerowych (Tab. 19) wpłynęło na wzrost heterozygotyczności obserwowanej, szczególnie dla populacji karlika drobnego i tym samym spadek wskaźnika wsobności F_{IS} także silniej zaznaczony u karlika drobnego. W przypadku karlika drobnego ponad dwukrotnie wzrósł współczynnik F_{ST} (ale była to zmiana na trzecim miejscu po przecinku, więc nie można tego uznać za znaczące). Różnice międzygatunkowe nadal pozostały nieistotne.

Tabela 19. Wskaźniki bogactwa allelicznego, heterozygotyczności, poziomu wsobności i spokrewnienia oraz F_{ST} — porównanie gatunków na podstawie 1000 permutacji dla prób z poprawką dla alleli zerowych.

Gatunek	Bogactwo alleliczne	Ho	He	F_{IS}	F_{ST}	Rel
Karlik drobny	1,833	0,724	0,872	0,149	0,008	0,013
Karlik malutki	1,867	0,781	0,869	0,101	0,014	0,025
p dla różnic międzygatunkowych	0,278	0,232	0,601	0,237	0,531	0,538

Przy porównaniu gatunków z uwzględnieniem kolonii o liczebności większej niż pięć osobników i z poprawką dla alleli zerowych zaobserwowane zmiany dotyczyły przede wszystkim wartości oszacowania dla bogactwa allelicznego (wskazując wyraźniej na brak różnic pomiędzy gatunkami) i heterozygotyczności obserwowanej u populacji karlika drobnego. U obu gatunków nieznacznie spadły wartości wskaźnika F_{ST} (Tab. 20).

Tabela 20. Wskaźniki bogactwa allelicznego, heterozygotyczności, poziomu wsobności i spokrewnienia oraz F_{ST} — porównanie gatunków na podstawie 1000 permutacji dla kolonii o liczebności większej niż pięć osobników.

Gatunek	Bogactwo alleliczne	Ho	He	F_{IS}	F_{ST}	Rel
Karlik drobny	1,874	0,747	0,874	0,145	0,006	0,010
Karlik malutki	1,870	0,781	0,869	0,101	0,013	0,021
p dla różnic międzygatunkowych	0,915	0,402	0,532	0,364	0,615	0,601

Porównanie gatunków w oparciu o współczynniki oparte na modelu krokowym mutacji także wskazuje na znaczne podobieństwo pod względem zróżnicowania badanych gatunków (Tab. 21). Współczynnik wsobności R_{IS} , podobnie jak w przypadku przytoczonych wcześniej porównań, jest większy u karlika drobnego, natomiast dystans genetyczny R_{ST} , w odróżnieniu od F_{ST} , jest ponad trzykrotnie niższy u karlika malutkiego niż u karlika drobnego (obie wartości cechuje jednak duże odchylenie standardowe).

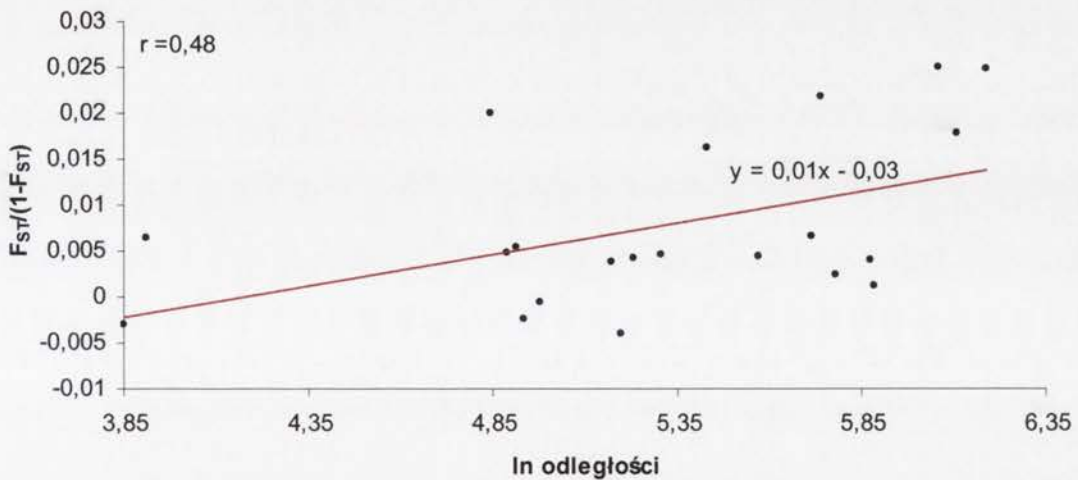
Tabela 21. Porównanie wskaźników opartych na krokowym modelu mutacji dla kolonii o liczebności większej niż pięć osobników. W nawiasach podane zostało odchylenie standardowe.

Gatunek	R_{IS}	R_{ST}
Karlik drobny	0,296 (0,043)	0,032 (0,017)
Karlik malutki	0,165 (0,061)	0,010 (0,007)

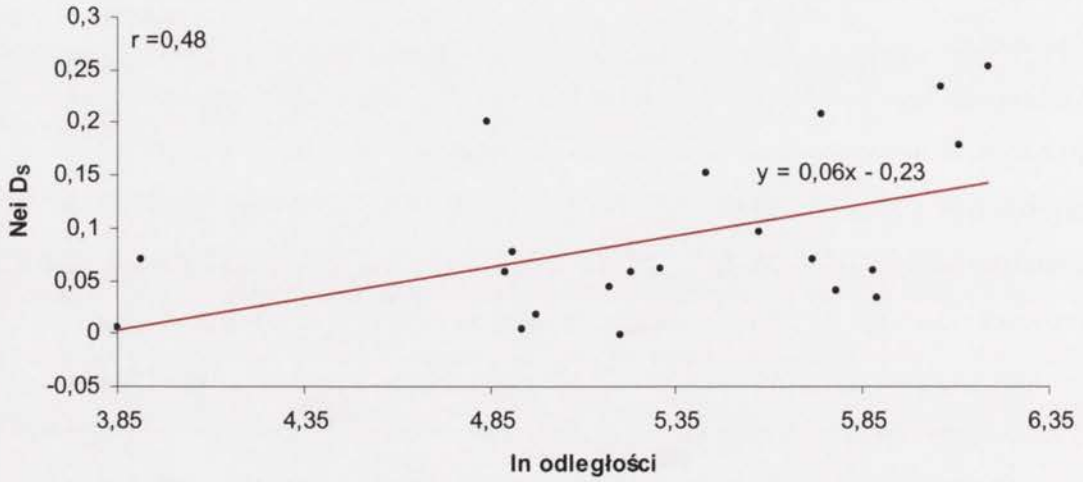
TEST NA IZOLACJĘ PRZEZ DYSTANS

Dla karlika malutkiego test Mantela, sprawdzający, czy istnieje liniowa zależność między dystansem genetycznym a logarytmem dystansu geograficznego dla różnych miar dystansu genetycznego, nie pozwolił na przyjęcie ani odrzucenie hipotezy o izolacji przez dystans. Wprawdzie dla wszystkich zastosowanych miar współczynnik korelacji przyjmował wartości ujemne, ale były one wysoce nieistotne statystycznie. Prawidłowość ta dotyczyła zarówno prób oryginalnych, jak i po poprawce dla alleli zerowych. Podobne wyniki otrzymano również po usunięciu z analiz kolonii zimowej z Krzyża Wielkopolskiego. Dla zlinearyzowanego F_{ST} i D_S Nei wartości współczynnika

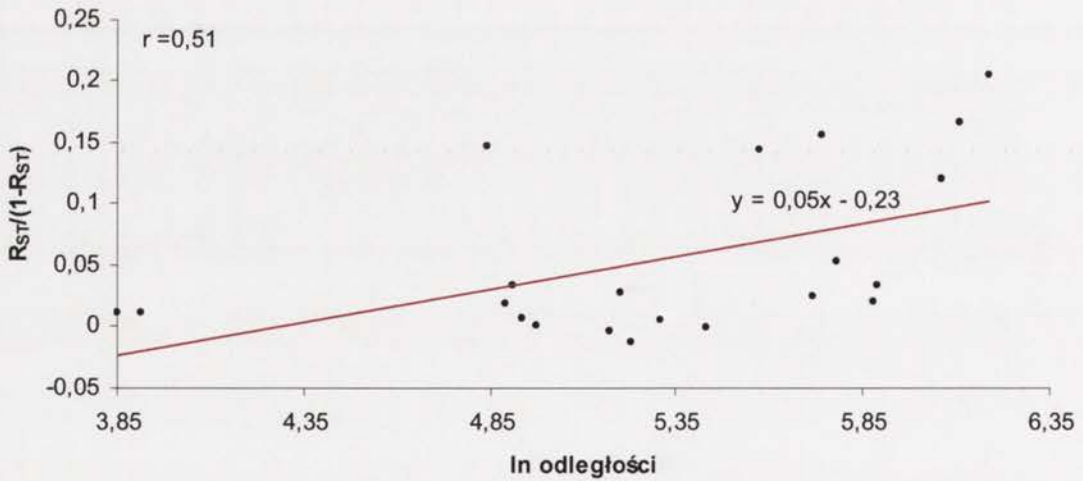
były zbliżone i wynosiły odpowiednio $-0,15$ ($p = 0,58$) i $-0,14$ ($p = 0,62$), natomiast dla zlinearyzowanego R_{ST} wartość korelacji wynosiła $-0,05$ ($p = 0,86$). Dla prób z poprawką dla alleli zerowych dla zlinearyzowanego F_{ST} i D_S Nei współczynnik wynosił odpowiednio $-0,37$ ($p = 0,17$) oraz $-0,14$ ($p = 0,61$). Po usunięciu kolonii z Krzyża Wielkopolskiego współczynnik korelacji przyjmował dla wszystkich dystansów oprócz zlinearyzowanego R_{ST} wartości nieco wyższe, ale wyniki nadal były nieistotne statystycznie: zlinearyzowane F_{ST} $-0,10$ ($p = 0,79$); D_S Nei $-0,06$ ($p = 0,88$); zlinearyzowane R_{ST} $-0,06$ ($p = 0,85$); zlinearyzowane F_{ST} po poprawce dla alleli zerowych $-0,33$ ($p = 0,36$); D_S Nei po poprawce dla alleli zerowych $-0,09$ ($p = 0,80$). Dla karlika drobnego w teście Mantela stwierdzono istotną statystycznie izolację przez dystans dla wszystkich trzech miar dystansu genetycznego. We wszystkich przypadkach współczynnik korelacji przyjmował podobne wartości. Dla zlinearyzowanego F_{ST} (Ryc. 5), D_S Nei (Ryc. 6.) oraz D_S Nei po poprawkach dla alleli zerowych było to $0,48$ ($p \leq 0,03$), dla zlinearyzowanego R_{ST} (Ryc. 7) $0,51$ ($p = 0,03$), a dla zlinearyzowanego F_{ST} po poprawkach dla alleli zerowych $0,44$ ($p = 0,04$).



Rycina 5. Zależność dystansu genetycznego (wyrażonego jako zlinearyzowany współczynnik F_{ST}) od logarytmu odległości geograficznej (w km) dla par kolonii karlika drobnego.



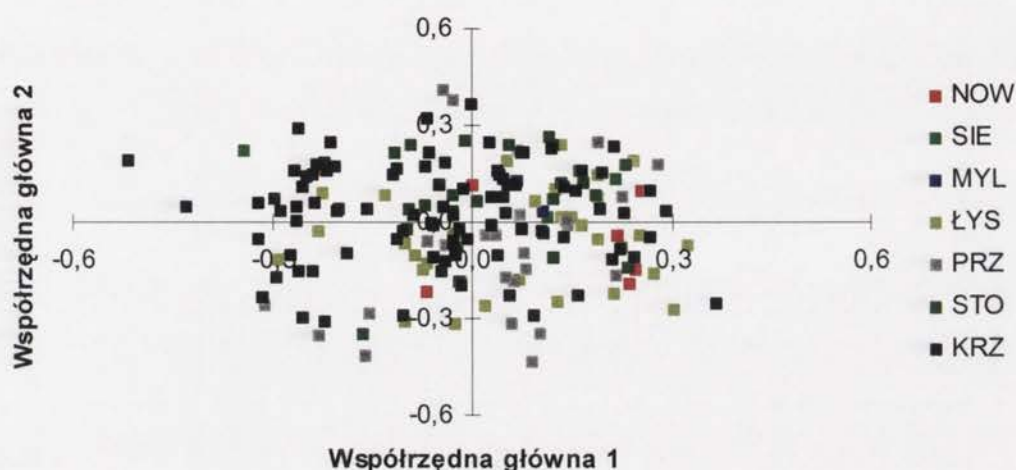
Rycina 6. Zależność dystansu genetycznego (wyrażonego jako D_S Nei) od logarytmu odległości geograficznej (w km) dla par kolonii karlika drobnego.



Rycina 7. Zależność dystansu genetycznego (wyrażonego jako zlinearyzowany współczynnik R_{ST}) od logarytmu odległości geograficznej (w km) dla par kolonii karlika drobnego.

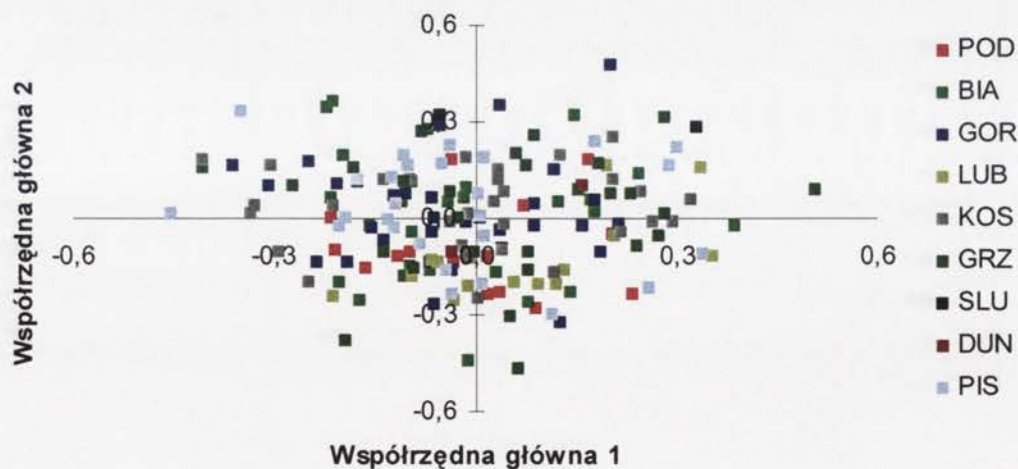
STRUKTURA POPULACJI — ANALIZA GŁÓWNYCH WSPÓRZĘDNYCH

U karlika malutkiego pierwsze trzy główne współrzędne odpowiadały łącznie za 55,4% zmienności, odpowiednio za: 19,6, 18,5 i 17,4%. Struktura genetyczna nie była widocznie zaznaczona (Ryc. 8) — próby z poszczególnych kolonii były rozproszone, nie było też żadnych innych wyraźnych skupisk prób.



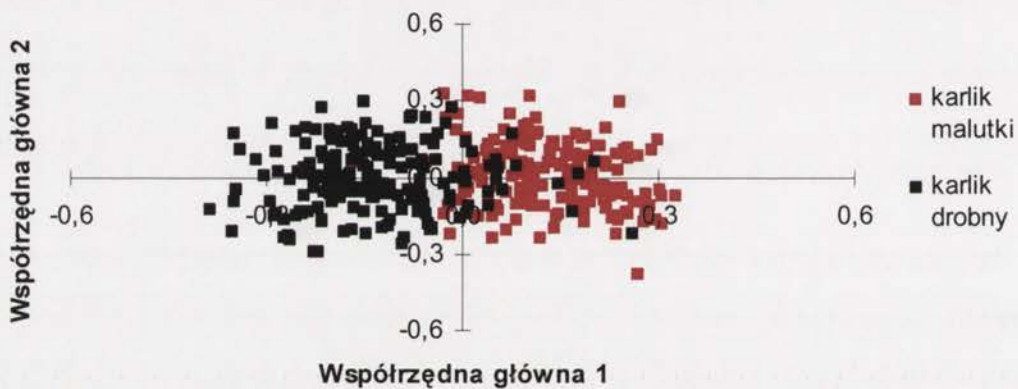
Rycina 8. Zmienność dystansu genetycznego w populacji karlika malutkiego.

Wyniki dla karlika drobnego były bardzo zbliżone — pierwsze trzy główne współrzędne odpowiadały za 55,6% zmienności, odpowiednio za: 19,5, 18,5 i 17,6%. Tutaj także rozkład prób wydawał się zupełnie losowy (Ryc. 9).



Rycina 9. Zmienność dystansu genetycznego w populacji karlika drobnego.

W przypadku analizy wspólnej dla obu gatunków trzy główne współrzędne odpowiadały za 59,7% zmienności, odpowiednio za: 28,5, 16,4 i 14,8%. Podział na gatunki był wyraźny, choć nie całkowity (Ryc. 10). Skupiska odpowiadające poszczególnym gatunkom były stosunkowo rozproszone i nieco się na siebie nakładały. Ponadto trzy osobniki karlika malutkiego zdecydowanie bardziej przesunięte były w stronę centrum skupiska odpowiadającego karlikowi drobnemu — były to osobniki z kolonii Mylin, Stolec i Krzyż Wielkopolski. Z kolei 11 osobników karlika drobnego zlokalizowanych było w skupisku karlika malutkiego i było to pięć osobników z Lubni raz po trzy osobniki z Poddębna i znad Jeziora Pisocznego.



Rycina 10. Zmienność dystansu genetycznego w populacji karlików malutkiego i drobnego.

PODZIAŁ POPULACJI NA GRUPY— SAMOVA

Procedura SAMOVA (przy zadanym podziale na dwie grupy jako najlepszy (minimalizujący wariancję subpopulacji) wskazała podział badanych 13 kolonii odpowiadający podziałowi na gatunki. Wskaźnik F_{CT} był zdecydowanie niższy dla wszystkich innych sprawdzonych podziałów i wahał się od -0,032 do 0,004, podczas gdy dla podziału na gatunki przyjmował wartość 0,189. Wyniki AMOVA (Tab. 22) wskazały 19,0% zmienności pomiędzy gatunkami. Wszystkie wskaźniki F_{CT} (V_a), F_{SC} (V_b), F_{IS} (V_c) i F_{IT} (V_d) były istotne statystycznie: $p = 0,000$ (test permutacji z 1000 powtórzeń). Wartości wskaźników wyniosły:

- $F_{CT} = 0,190$;
- $F_{SC} = 0,024$;
- $F_{IS} = 0,242$;
- $F_{IT} = 0,401$.

Tabela 22. Test AMOVA dla podziału na gatunki badanych kolonii.

Zródło wariacji	Stopnie swobody	Suma kwadratów	Składowe zmienności	Procent wariacji (%)
Między gatunkami	1	10097,6	27,25 (Va)	18,98
Między koloniami w obrębie gatunku	11	3082,1	2,82 (Vb)	1,96
Między osobnikami w koloniach	344	48480,1	27,44 (Vc)	19,11
Między osobnikami	357	30721,5	86,05 (Vd)	59,94
Suma	713	92381,2	143,56	100

Wyniki SAMOVA dla podziału na trzy grupy wyodrębniły jako trzecią grupę samą kolonię z Lubni, a pozostałe dwie grupy odpowiadały podziałowi na gatunki. Przy podziale na cztery grupy powyższy podział został zachowany z wyłączeniem jako czwartej grupy kolonii z Nowolesia. I tak do aż do podziału na 11 grup; za każdym razem wyłaniania była kolejno jedna kolonia, w kolejności: Siemysławice, Gaj-Grzmieca, Poddębie, Jezioro Pisocne, Górki Kościelne, Górki, Przeworno. Przy podziale na 12 grup wydzielona została zarówno kolonia ze Stolca, jak i z Krzyża Wielkopolskiego, a kolonia z Łysomic została ponownie połączona z Lubnią. Zmienność między grupami była niższa od tej uzyskanej dla podziału na dwa gatunki, z wyjątkiem dwóch przypadków: podziału na cztery (wyłączone Nowolesie oraz Lubnia) i na pięć grup (dodatkowo wyłączone Siemysławice). W pierwszym z wymienionych przypadków zmienność między grupami wynosiła 20,0% a w drugim — 19,7% (wszystkie wskaźniki były istotne statystycznie).

Podział na grupy przeprowadzony odrębnie dla obu gatunków w obu przypadkach prowadził do wyodrębniania kolejno jednej kolonii jako następnej grupy. Dla karlika malutkiego były to kolejno kolonie z: Nowolesia, Siemysławic i Przeworna. Przy podziale na pięć grup wyłączona została kolonia z Krzyża Wielkopolskiego i jako oddzielna grupa kolonia ze Stolca, a Siemysławice zostały ponownie połączone z Łysomicami. Różnice między grupami kształtowały się między 2,7% (przy podziale na cztery grupy) a 7,3% (dla dwóch grup), przy czym test permutacji dla wskaźników F_{CT} pokazał, że wyniki te, choć są do niego w większości zbliżone, nie osiągają założonego 5-procentowego poziomu istotności. Dla karlika drobnego jako pierwsza

została oddzielona kolonia z Lubni, następnie z Gaj-Grzmięcy, znad Jeziora Pisocnego, Poddebia i z Górek Kościelnych. Procent zmienności między grupami był nieco wyższy niż w przypadku karlika malutkiego. Najwyższy był dla podziału na dwie grupy i wynosił 15,7%, a najniższy był dla podziału na 6 grup i wynosił 6,8%, ale wyniki te również nie były istotne statystycznie.

Dla podziału wszystkich kolonii na dwie grupy sprowadzono także analizę AMOVA F_{ST} -like (w programie Arlequin; Excoffier i in. 2005). Na podstawie wyników AMOVA (Tab. 23) stwierdzono 4,5% zmienności genetycznej pomiędzy gatunkami. Wskaźniki F_{SC} (Vb), F_{IS} (Vc), F_{IT} (Vd) były istotne statystycznie z $p = 0,000$ (test permutacji z 1000 powtórzeń), a wskaźnik F_{CT} (Va) z $p = 0,001$. Wartości wskaźników wynosiły:

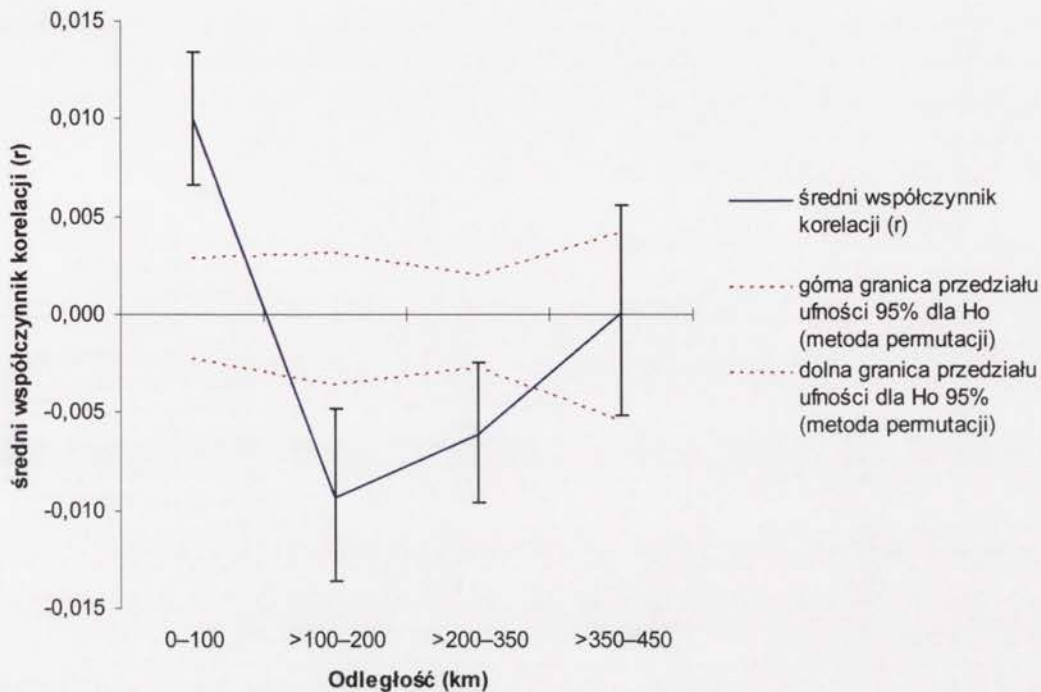
- $F_{CT} = 0,045$;
- $F_{SC} = 0,010$;
- $F_{IS} = 0,219$;
- $F_{IT} = 0,262$.

Tabela 23. Test AMOVA (F_{ST} -like) dla podziału na gatunki badanych kolonii.

Zródło wariacji	Stopnie swobody	Suma kwadratów	Składowe zmienności	Procent wariacji (%)
Między gatunkami	1	66,4	0,17 (Va)	4,57
Między koloniami w obrębie gatunku	11	64,0	0,03 (Vb)	0,90
Między osobnikami w koloniach	344	1443,7	0,75 (Vc)	20,60
Między osobnikami	357	962,0	2,69 (Vd)	73,93
Suma	713	25361,0	3,65	100,0

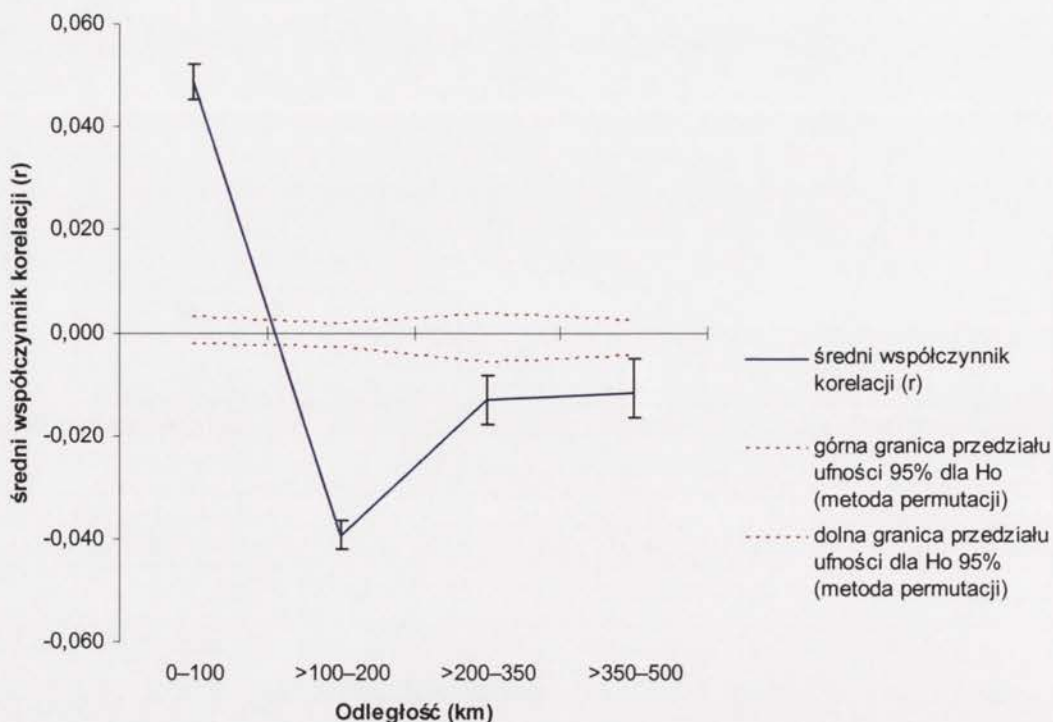
ANALIZA PRZESTRZENNEJ AUTOKORELACJI

Dla populacji karlika malutkiego hipoteza o braku przestrzennej autokorelacji (świadczącej o panmiksji) została odrzucona. Wartość korelacji była dodatnia dla najmniejszej z klas odległości (0–100 km). Dla dwóch kolejnych klas, >100–200 km oraz >200–350 km, wprowadzie wartości korelacji były ujemne, ale poza przedziałem ufności dla hipotezy o panmiksji. Jedynie dla klasy największych odległości wartość korelacji była równa zero i mieściła się w przedziale ufności (wyznaczonym metodą permutacji) dla hipotezy o panmiksji i tylko górna granica wyznaczona metodą *bootstrap* dla tego współczynnika minimalnie przekraczała ten przedział ufności (Ryc. 11).



Rycina 11. Przestrzenna autokorelacja w czterech klasach odległości geograficznej dla populacji karlika malutkiego. Górne i dolne zakresy błędów (czarne linie) wyznaczają 95% przedział ufności wyznaczony dla współczynnika korelacji metodą *bootstrap*.

Dla populacji karlika drobnego hipoteza o braku przestrzennej autokorelacji została również odrzucona. Kształt funkcji (Ryc. 12) ukazującej zależność współczynnika korelacji od odległości był zbliżony do tego uzyskanego dla populacji karlika malutkiego (Ryc. 11). Wartość średniego współczynnika korelacji dla najmniejszej z klas odległości (0–100 km) była dodatnia, ale nieco niższa niż u karlika malutkiego. Dla dwóch kolejnych klas odległości wartość korelacji była ujemna i najniższa dla klasy >100–200 km. Wartość korelacji dla klasy najdalszych odległości była zbliżona do zera (właściwie była ona taka sama jak dla klasy trzeciej, ale z górną granicą słupka błędów wyznaczonego metoda *bootstrap* bliższą zeru).



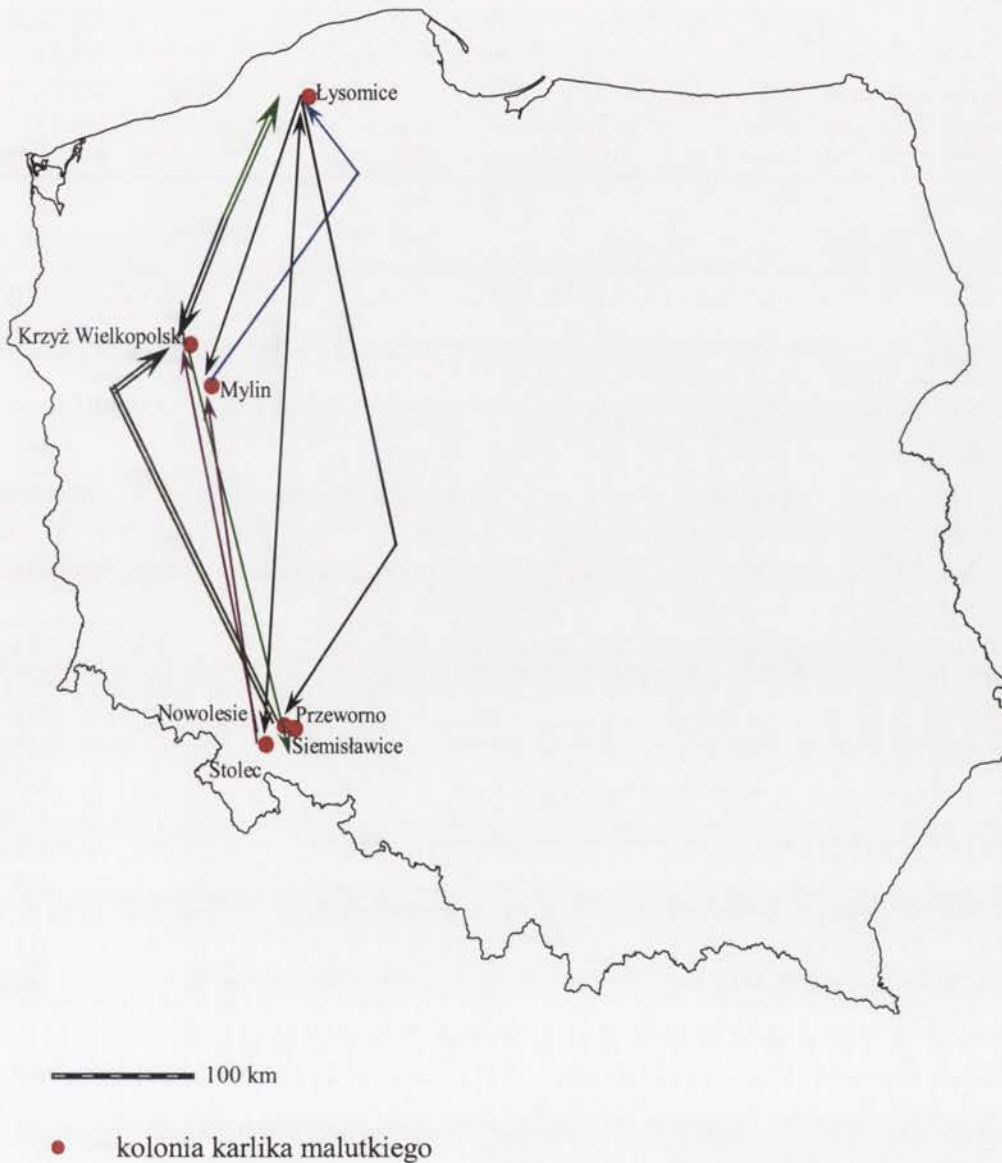
Rycina 12. Przestrzenna autokorelacja w czterech klasach odległości geograficznej dla populacji karlika drobnego. Górne i dolne zakresy błędów (czarne linie) wyznaczają 95% przedział ufności wyznaczony dla współczynnika korelacji metodą *bootstrap*.

MIGRACJA

W populacji karlika malutkiego 80 (43%) osobników zostało przypisanych do kolonii, w których zostały złapane. Indeks jakości wynosił 26,8%. W poszczególnych koloniach udział osobników przypisanych do miejsca schwywania zawierał się w zakresie od 0% dla Siemysławic i Mylina do blisko 62% dla Łysomic i Stolca (Tab. 24). Najwięcej osobników przypisanych do innych kolonii niż miejsce ich schwywania zostało określonych jako osobniki pochodzące ze Stolca (36 przypadków), z czego najwięcej w kolonii z Krzyża Wielkopolskiego — aż 20 osobników (co stanowi 22% badanej próby), oraz licznie w kolonii z Przeworna (dziewięć osobników, co stanowi aż 38% badanej próby). Liczna grupa osobników nieprzypisanych do miejsca schwywania została także określona jako pochodzące z Łysomic — 20 przypadków, z czego 15 osobników (16% próby) przypisanych zostało do Krzyża Wielkopolskiego. Z kolei osobniki uznane za pochodzące z Krzyża Wielkopolskiego zostały dość licznie przypisane do Łysomic (pięć osobników, 15% próby).

W teście na migrantów w pierwszym pokoleniu stwierdzono obecność 14 takich osobników w całej populacji, przy czym imigranci zostali stwierdzeni we wszystkich

koloniach oprócz Nowolesia. Najliczniejsza grupa emigrantów stwierdzona została w Krzyżu Wielkopolskim (pięć osobników). Druga, co do liczności grupa emigrantów (cztery osobniki) obecna była w Łysomicach. W czterech przypadkach była to krzyżowa migracja pomiędzy wyżej wymienionymi koloniami (Ryc. 13).



Rycina 13. Migracje w pierwszym pokoleniu między koloniami karlika malutkiego (podwójne strzałki oznaczają dwa osobniki).

Tabela 24. Liczba osobników przypisanych do danej kolonii — w nawiasach w przeliczeniu na procentowy udział w kolonii (%). Poszczególne kolonie przedstawione są w kolumnach (pogrubioną czcionką zaznaczono liczbę osobników przypisanych do kolonii, w której zostały schwytane).

Kolonia	NOW N = 7	SIE N = 3	ŁYS N = 34	PRZ N = 24	STO N = 21	MYL N = 2	KRZ N = 92
NOW	1(14,3)		2(5,9)	3(12,5)	1(4,8)	1(50,0)	5(5,4)
SIE					1(4,8)		
ŁYS	2(28,6)	1(33,3)	21(61,8)	1(4,2)	1(4,8)		15(16,3)
PRZ	1(14,3)			10(41,7)	2(9,5)		1(1,1)
STO	1(14,3)	1(33,3)	4(11,8)	9(37,5)	13(61,9)	1(50,0)	20(21,7)
MYL			2(5,9)	1(4,2)	2(9,5)		1(1,1)
KRZ	2(28,6)	1(33,3)	5(14,7)		1(4,8)		50(54,3)

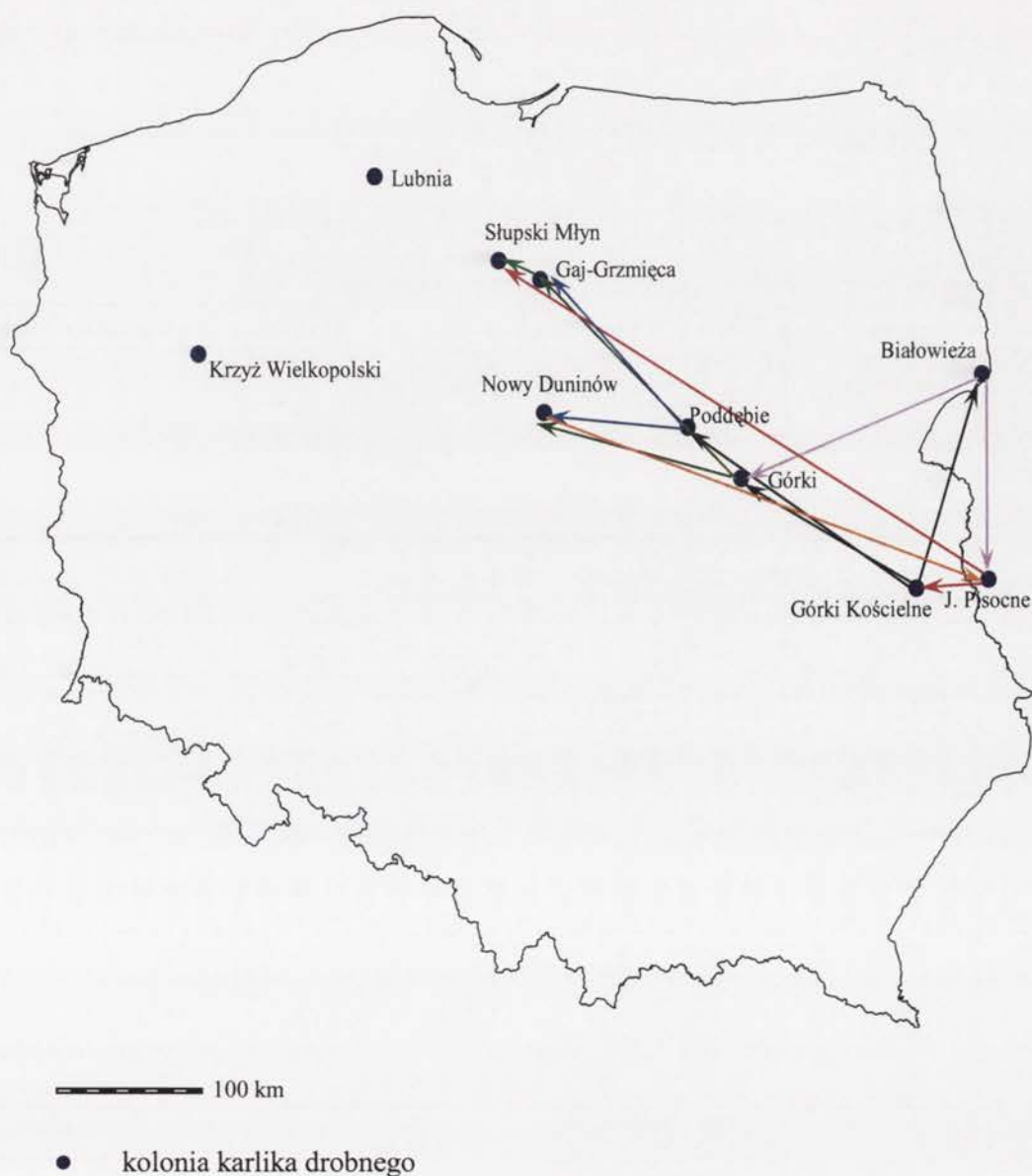
W populacji karlika drobnego 48 (27%) osobników zostało przypisanych do kolonii, w których zostały złapane. Indeks jakości wynosił 17,5%. W poszczególnych koloniach udział osobników przypisanych do miejsca schwytania zawierał się w zakresie od 0% dla Nowego Duninowa i Słupskiego Młyna do 60% dla Lubni

Tabela 25. Liczba osobników przypisanych do danej kolonii — w nawiasach w przeliczeniu na procentowy udział w kolonii (%). Poszczególne kolonie przedstawione są w kolumnach (pogrubioną czcionką zaznaczono liczbę osobników przypisanych do kolonii, w której zostały schwytane).

Kolonia	POD N = 15	BIA N = 29	GOR N = 32	LUB N = 15	KOS N = 30	GRZ N = 25	SŁU N = 2	DUN N = 2	PIS N = 27
POD	3(20,0)	5(17,2)	5(15,6)	1(6,7)	5(16,7)	2(8,0)		1(50,0)	2(7,4)
BIA	2(13,3)	7(24,1)	2(6,3)		2(6,7)	3(12,0)			3(11,1)
GOR	2(13,3)	3(10,3)	9(28,1)	3(20,0)	2(6,7)	2(8,0)			1(3,7)
LUB	5(33,3)	3(10,3)	6(18,8)	9(60,0)	5(16,7)	4(16,0)		1(50,0)	4(14,8)
KOS	2(13,3)	6(20,7)	5(15,6)		11(36,7)	6(24,0)			4(14,8)
GRZ				1(6,7)	2(6,7)	5(20,0)			2(7,4)
SŁU		2(6,9)							
DUN				1(6,7)					1(3,7)
PIS	1(6,7)	3(10,3)	5(15,6)		3(10,0)	3(12,0)	2(100,0)		10(37,0)

Największa liczba osobników (28) przypisanych do innych kolonii niż ta, będąca miejscem schwytania, pochodziła z Lubni, w tym sześć osobników przypisanych zostało do Górek (19% próby), po pięć do Poddębna (33%) i Górek Kościelnych (17%) oraz cztery osobniki (15%) do kolonii znad Jeziora Pisocznego. Liczną grupę stanowiły także osobniki (23) z Górek Kościelnych, z czego najwięcej, bo po sześć osobników, przypisanych zostało do Białowieży (21%) i Gaj-Grzmięcy (24%), pięć do Górek (16%) i cztery osobniki do kolonii znad Jeziora Pisocznego (15%). Liczną grupę stanowiły także osobniki (21) z Poddębna, z czego po pięć osobników przypisanych zostało do Białowieży (17%), Górek (16%) oraz Górek Kościelnych (17%). W teście na

migrantów w pierwszym pokoleniu stwierdzono obecność 13 takich osobników w całej populacji. Stwierdzeni zostali we wszystkich koloniach z wyjątkiem kolonii z Lubni. Liczba imigrantów w żadnej kolonii nie była wyższa niż dwa osobniki i w żadnym przypadku nie były to osobniki, które pochodziły z tego samego miejsca (tzn. dla których wskaźnik podobieństwa był najwyższy dla tej samej kolonii). Największą grupą emigrantów (trzy osobniki) wywodziła się Górek Kościelnych i byli to imigranci w koloniach: Poddebie, Białowieża i Górki (Ryc. 14).



Rycina 14. Migracje w pierwszym pokoleniu między koloniami karlika drobnego.

OSZACOWANIE EFEKTU „SZYJKI OD BUTELKI”

Dla populacji karlika malutkiego we wszystkich koloniach, zarówno dla prób oryginalnych, jak i z poprawionymi allelami zerowymi, stwierdzono istotny statystycznie nadmiar heterozygotyczności obserwowanej w stosunku do spodziewanej dla takiej liczby alleli przy przyjęciu mieszanego modelu mutacji (TPM) — świadczy to o efekcie „szyjki od butelki” (Tab. 26). Dla żadnej z prób nie zaobserwowano przesunięcia kształtu krzywej obrazującej frekwencję alleli. Dla całej populacji nadmiar heterozygotyczności był istotny statystycznie dla próby oryginalnej ($p = 0,014$), natomiast nie był istotny dla próby z poprawionymi allelami zerowymi ($p = 0,125$). W obu przypadkach krzywa była L-kształtna.

Tabela 26. Wartość p dla testu Wilcocona z hipotezą alternatywną o nadmiarze heterozygotyczności dla kolonii karlika malutkiego.

Kolonia	Próba oryginalna	Próba z allelami zerowymi
NOW	0,027	0,027
ŁYS	0,006	0,006
PRZ	0,002	0,002
STO	0,004	0,002
KRZ	0,036	0,012

U karlika drobnego we wszystkich koloniach zarówno dla prób oryginalnych, jak i z poprawionymi allelami zerowymi, również zaobserwowano nadmiar heterozygotyczności (Tab. 27). Dla większości prób obserwowane było także przesunięcie kształtu krzywej, obrazującej frekwencję alleli, względem krzywej L-kształtnej. Dla całej populacji nadmiar heterozygotyczności był istotny statystycznie dla próby oryginalnej ($p = 0,037$), ale poniżej poziomu istotności dla próby z poprawionymi allelami zerowymi ($p = 0,098$).

Tabela 27. Wartość p dla testu Wilcocona z hipotezą alternatywną o nadmiarze heterozygotyczności oraz wyniki testu na kształt krzywej (+ oznacza jej przesunięcie).

Kolonia	Próba oryginalna	Próba z allelami zerowymi
POD	0,039 +	0,006 +
BIA	0,002 +	0,002 +
GOR	0,004 +	0,002
LUB	0,027	0,006 +
KOS	0,002	0,002
GRZ	0,002+	0,002 +
PIS	0,002+	0,002 +

EFEKTYWNA WIELKOŚĆ POPULACJI

Oszacowana efektywna wielkości populacji (N_e) w programie NeEstimator była w przybliżeniu dwukrotnie większa dla karlika malutkiego i wynosiła 229 (95% przedział ufności 196,4–257,6) dla oryginalnej próby i 243,2 (212,4–282,5) dla próby z odtworzonymi allelami zerowymi niż dla karlika drobnego odpowiednio: 115 (105,8–125,4) i 128 (118–140,4). W przypadku kolonii karlika malutkiego wartość oszacowania była największa dla kolonii z Krzyża Wielkopolskiego, a najmniejsza dla kolonii z Nowolesia (Tab. 28).

Tabela 28. Efektywna wielkość populacji wraz z przedziałem ufności dla poszczególnych kolonii karlika malutkiego (NeEstimator).

Kolonia	Próba oryginalna		Próba z allelami zerowymi	
	Ne	95% przedział ufności	Ne	95% przedział ufności
NOW	16,9	(10,3; 39,9)	16,4	(10,2; 36,6)
ŁYS	129,4	(84,1; 261,4)	150,5	(94,8; 337,6)
PRZ	53,7	(39,8; 79,4)	54,2	(39,9; 81,3)
STO	105,3	(62,0; 301,7)	105,9	(63,1; 289,8)
KRZ	217,1	(163,2; 315,2)	216,9	(165,3; 307,5)

Oszacowanie N_e przeprowadzone dla prób oryginalnych w programie *LDNE* dało inne wartości oszacowań. Jedynie wyniki dla kolonii z Przeworna były zbliżone. Dla całej populacji oszacowanie efektywnej wielkości populacji było ujemne (Tab. 29). Przedziały ufności ocenione zostały dwiema metodami: testem parametrycznym i algorytmem „*jackknife over loci*”, natomiast wartość N_e podano dla trzech różnych założeń najniższej frekwencji alleli: 0,05, 0,02 i 0,01. W przypadku oszacowań ujemnych nie podano wartości dla przedziałów ufności (domyślnie należy przyjąć, że granicą przedziału jest nieskończoność).

Tab. 29. Efektywna wielkość populacji wraz z przedziałem ufności dla poszczególnych kolonii karlika malutkiego (*LDNE*).

Kolonia	Najniższa frekwencja alleli	Ne	95% przedział ufności (test parametryczny)	95% przedział ufności
NOW	0,05	-22,0		
	0,02	-22,0		
	0,01	-22,0		
ŁYS	0,05	737,9	(96,6; ∞)	(94,2; ∞)
	0,02	453,6	(129,6; ∞)	(122,0; ∞)
	0,01	203,9	(101,6; 2607,2)	(87,2; ∞)
PRZ	0,05	45,4	(26,2; 116,6)	(26,0; 118,8)
	0,02	49,7	(30,4; 109,8)	(30,9; 105,6)
	0,01	66,1	(41,3; 142,9)	(41,0; 145,7)
STO	0,05	-1234,2		
	0,02	344,6	(85,8; ∞)	(93,0; ∞)
	0,01	344,6	(85,8; ∞)	(93,0; ∞)
KRZ	0,05	28601,3	(351,3; ∞)	(295,3; ∞)
	0,02	-741,8		
	0,01	-2657,5		

U karlika drobnego oszacowana efektywna wielkość populacji w programie NeEstimator największa była dla kolonii z Gaj-Grzmiący, a najmniejsza dla kolonii z Podłębia (Tab. 30).

Tabela 30. Efektywna wielkość populacji wraz z przedziałem ufności dla poszczególnych kolonii karlika drobnego (NeEstimator)

Kolonia	Próba oryginalna		Próba z allelami zerowymi	
	Ne	95% przedział ufności	Ne	95% przedział ufności
POD	43,0	(28,1; 84,3)	42,4	(28,2; 79,5)
BIA	218,1	(103,1; ∞)	216,0	(105,0; 21007,9)
GOR	118,0	(74,9; 256,4)	119,0	(76,0; 256,4)
LUB	39,6	(27,8; 65,3)	44,1	(30,5; 75,6)
KOS	86,3	(60,3; 144,9)	91,7	(63,6; 156,6)
GRZ	241,4	(92,9; ∞)	213,0	(91,3; ∞)
PIS	150,3	(81,4; 713,6)	161,7	(86,6; 858,2)

W przypadku oszacowań przeprowadzonych w *LDNE*, podobnie jak u karlika malutkiego, uzyskano znacznie różniące się wartości, a efektywna wielkość populacji oszacowana dla wszystkich prób razem także była ujemna (Tab. 31).

Tabela 31. Efektywna wielkość populacji wraz z przedziałem ufności dla poszczególnych kolonii karlika drobnego (*LDNE*)

Kolonia	Najniższa frekwencja alleli	Ne	95% przedział ufności (test parametryczny)	95% przedział ufności
POD	0,05	71,4	(25,7; ∞)	(35,5; 703,9)
	0,02	248,7	(46,5; ∞)	(56,9; ∞)
	0,01	248,7	(46,5; ∞)	(56,7; ∞)
BIA	0,05	-11520,0		
	0,02	697,7	(99,8; ∞)	(101,5; ∞)
	0,01	7284,7	(149,2; ∞)	(135,6; ∞)
GOR	0,05	186,2	(65,2; ∞)	(69,6; ∞)
	0,02	237,7	(90,5; ∞)	(94,2; ∞)
	0,01	153,0	(80,3; 853,5)	(83,1; 654,6)
LUB	0,05	39,8	(20,1; 207,6)	(26,1; 75,4)
	0,02	168,3	(48,1; ∞)	(81,7; ∞)
	0,01	168,3	(48,1; ∞)	(81,7; ∞)
KOS	0,05	556,2	(91,0; ∞)	(89,5; ∞)
	0,02	335,8	(103,1; ∞)	(112,6; ∞)
	0,01	117,1	(66,2; 389,3)	(52,6; ∞)
GRZ	0,05	293,5	(54,4; ∞)	(62,2; ∞)
	0,02	-547,5		
	0,01	-547,5		
PIS	0,05	106,8	(47,0; ∞)	(53,9; 841,9)
	0,02	482,8	(91,8; ∞)	(115,0; ∞)
	0,01	495,9	(106,9; ∞)	(118,3; ∞)

SPOKREWNENIE

Współczynnik spokrewniania dla całej populacji karlika malutkiego wyniósł 0,0092 (z błędem standardowym 0,0018 i 95% przedziałem ufności 0,0042). Dla poszczególnych kolonii średni współczynnik spokrewnienia zawierał się w przedziale od -0,0004 (dla kolonii z Nowolesia i Stolca) do 0,0154 (kolonia z Krzyża Wielkopolskiego). Tylko dla kolonii z Krzyża Wielkopolskiego średni współczynnik spokrewnienia był wyższy niż dla całej populacji (Tab. 32).

Tabela 32. Średni współczynnik spokrewnienia dla kolonii karlika malutkiego.

Parametr	NOW	SIE	ŁYS	PRZ	STO	MYL	KRZ
Rel	-0,0004	0,0005	0,0038	0,0065	-0,0004	-0,0005	0,0154
Błąd standartowy	0,0012	0,0009	0,0016	0,0022	0,0010	0,0004	0,0035
95% przedział ufności	0,0028	0,0021	0,0038	0,0051	0,0024	0,0010	0,0083

Korelacja między średnim współczynnikiem spokrewnienia a F_{IS} , była niska (0,28, $p < 0,05$), a w przypadku oszacowania F_{IS} po poprawce dla alleli zerowych ujemna (-0,62, $p < 0,05$).

Współczynnik spokrewniania dla całej populacji karlika drobnego wyniósł 0,0013 (z błędem standardowym 0,0006 i 95% przedziałem ufności 0,0014). Dla poszczególnych kolonii średni współczynnik spokrewnienia zawierał się w granicach od -0,0009 (Lubnia) do 0,0029 (Białowieża); dla trzech kolonii średni współczynnik spokrewnienia był wyższy niż dla całej populacji — dla kolonii z Białowieży, Gaj-Grzmiący i znad Jeziora Pisocnego (Tab. 33).

Tabela 33. Średni współczynnik spokrewnienia dla kolonii karlika drobnego.

Parametr	POD	BIA	GOR	LUB	KOS	GRZ	ŚLU	DUN	PIS
Rel	0,0005	0,0029	0,0013	-0,0009	0,0004	0,0024	0,0005	0,0001	0,0015
Błąd standardowy	0,0015	0,0020	0,0019	0,0018	0,0008	0,0014	0,0011	0,0007	0,0018
95% przedział ufności	0,0035	0,0047	0,0046	0,0043	0,0019	0,0033	0,0026	0,0017	0,0043

Korelacja między średnim współczynnikiem spokrewnienia a F_{IS} była ujemna zarówno dla prób oryginalnych, jak i po poprawce dla alleli zerowych — odpowiednio -0,22 oraz -0,45 ($p < 0,05$ w obu przypadkach).

Dyskusja

OCENA MARKERÓW — ALLELE ZEROWE ORAZ NIERÓWNOWAGA SPRZEŻEN

Allele zerowe, jeśli ich frekwencja jest dostatecznie wysoka, mogą zakłócić wyniki analiz, prowadząc chociażby do niedoszacowania zmienności genetycznej czy niesłusznego stwierdzenia odstępstwa od równowagi H-W (Paetkau i Strobeck 1995). Z kolei niedoszacowanie zmienności w obrębie populacji może prowadzić do zawyżenia wartości F_{ST} między populacjami (Paetkau i in. 1997, Slatkin 1995). Jednak wielu autorów podczas analizy danych nie bierze pod uwagę alleli zerowych — w pracy przeglądowej Dakin i Avise (2004) oszacowali, że w 90% prac, w których stwierdzono allele zerowe, nie zastosowano na nie żadnej poprawki. Podobnie było w przypadku pracy o genetyce populacyjnej karlików Racey'a i in. (2007), w której autorzy nie wspominają nawet, czy sprawdzali obecność takich alleli w próbie. W związku z tym, pomimo że sześć z ośmiu użytych w niniejszej pracy markerów było też stosowanych przez wyżej wymienionych autorów, nie można było porównać frekwencji alleli zerowych. Natomiast porównanie to było możliwe w przypadku pracy dotyczącej czeskiej i słowackiej populacji karlików (Bryja i in. 2009). Pięć markerów pokrywało się z zastosowanymi w niniejszej pracy (EF04, Ppip01, Ppip02, Ppip04, Ppip06). U obu gatunków karlików Bryja i in. (2009) stwierdzili obecność alleli zerowych we wszystkich z wymienionych loci (również w pozostałych zastosowanych przez nich markerach), przy czym dla locus Ppip02 frekwencja alleli zerowych była niska (0,016 dla populacji karlika malutkiego oraz 0,010 dla populacji karlika drobnego), a dla locus Ppip06 bardzo niska (dla populacji karlika malutkiego — 0,001). Dla pozostałych loci zawierała się w przedziale 0,022–0,140 dla karlika malutkiego i 0,052–0,246 dla karlika drobnego. W przypadku polskich prób nie stwierdzono wcale alleli zerowych w locus Ppip02 (Tab. 3 i 4). Dla pozostałych loci frekwencja alleli zerowych zawierała się w przedziale 0,001–0,028 dla karlika malutkiego oraz 0,004–0,020 dla karlika drobnego i była we wszystkich przypadkach niższa niż dla prób z pracy Bryi i in. (2009), z wyjątkiem locus Ppip06 u karlika malutkiego (0,001 versus 0,028). Wynik ten z jednej strony pokazuje, że allele zerowe w przypadku tego opracowania nie wydają się mieć kluczowego znaczenia (ich frekwencja jest niska) i nie wymagają tak restrykcyjnego podejścia, jak zastosowane przez Bryję i in. (2009), którzy we wszystkich obliczeniach uwzględniali dane z poprawioną frekwencją alleli oraz

wykorzystali specjalne procedury obliczeniowe zakładające poprawkę dla alleli zerowych (takie oszacowania są dyskusyjne i mogą być obarczone błędem), z drugiej strony jednak, allele zerowe powinny być wzięte pod uwagę przy analizie danych. Dlatego zastosowano rozwiązanie polegające na uwzględnieniu dwóch zestawów danych — oryginalnych i z wprowadzonymi poprawkami dla alleli zerowych. Należy tutaj także zwrócić uwagę, że metody szacowania frekwencji alleli zerowych opierają się na założeniach równowagi H-W w populacji i na porównywaniu obserwowanej i spodziewanej liczby homozygot w danej klasie wielkości alleli, w związku z tym stwierdzenie ich obecności może wynikać z odchylenia od równowagi H-W spowodowanej jakimś innym czynnikiem np. wysokim stopniem inbrodu w danej populacji, czy też obecnością substruktury w populacji (efekt Wahlunda) lub nielosowym pobieraniem prób — na przykład z grup rodzinnych powodujące wyższe spokrewnienia w obrębie próby niż rzeczywiste spokrewnienie dla populacji (Chapuis i Estoup 2007).

Allele zerowe nie są zjawiskiem tak rzadkim, jakby się to mogło wydawać (Chapuis i Estoup 2007), jednak ich istnienie wymaga zajścia specyficznej mutacji i ich obecność praktycznie we wszystkich markerach może skłaniać do podejrzeń, że stwierdzane są z któregoś z wcześniej wymienionych powodów. Chociażby z takiego, że ze względu na prowadzony przez nietoperze tryb życia, próby pobierane były z kolonii macierzystych, w których stopień spokrewnienia niekoniecznie odpowiada temu dla całej populacji. Ponadto stwierdzenia alleli zerowych nie są konsekwentne dla wszystkich kolonii — w żadnym przypadku nie zostały one stwierdzone we wszystkich koloniach danego gatunku. Oczywiście jest możliwe, że dany allel zerowy jest równocześnie allelem unikatowym dla danej kolonii, ale nie jest to wysoce prawdopodobne. Zastanawiający jest także fakt, że allele zerowe pojawiają się właściwie w którejś kolonii dla każdego markera — w pracy Bryi in. (2009) allele zerowe stwierdzone zostały też dla markerów nie stosowanych w tej pracy.

Podobne zjawisko szeroko rozprzestrzenionych alleli zerowych we wszystkich ośmiu badanych loci mikrosatelitarnych zaobserwowano także u innego gatunku nietoperza, nocka Bechsteina (Durrant i in. 2008). Autorzy pracy sugerowali, że zjawisko tak rozpowszechnionych alleli zerowych może być wynikiem oddziaływania jakiegoś innego czynnika niż rzeczywiste mutacje w sekwencjach flankujących tych loci. Podobnie jak w przypadku badanych karlików, w koloniach nocka Bechsteina stwierdzono odchylenie od równowagi H-W w kierunku deficytu heterozygot oraz

istotne statystycznie dodatnie wartości współczynnika wsobności (F_{IS}) — dla sześciu kolonii od 0,15 do 0,29.

W populacji karlika malutkiego stwierdzono w poszczególnych koloniach od dwóch do sześciu (na 28 możliwych) sprzężonych par loci, a w populacji karlika drobnego od trzech do 14 takich par. Jednak uważa się, że wykazana w testach nierównowaga sprzężeń może wynikać nie tyle z rzeczywistego fizycznego sprzężenia danych loci, ale może być skutkiem niedawnego wymieszania się populacji o różnych frekwencjach alleli, czy też intensywnej imigracji (Hartl i Clark 1997). Przykładowo w pracy dotyczącej populacji wilka (*Canis lupus*) z Europy Środkowo-Wschodniej (Pilot 2005) test na nierównowagę sprzężeń w danej subpopulacji także wykazał istnienie od kilku do kilkudziesięciu (na 14 loci mikrosatelitarnych) istotnych sprzężeń między poszczególnymi loci, podczas gdy wiadomo było, że znajdują się one na innych chromosomach. Test na nierównowagę sprzężeń może być także wrażliwy na nielosowy dobór prób albo wysoki stopień inbredu w obrębie danej grupy. Pośrednim potwierdzeniem tezy o nierównowadze sprzężeń, wynikającej z wysokiego stopnia inbredu, może być wynik uzyskany dla kolonii z Lubni (wykryto tutaj aż 14 potencjalnie sprzężonych par; Tab. 6), a była to właśnie kolonia o najwyższym współczynniku wsobności (Tab. 8.) spośród tych, dla których wykryto sprzężenia. Także w badaniach nad różnymi populacjami wilka stwierdzano istnienie nierównowagi sprzężeń wraz z wysokim stopniem inbredu, a autorzy doszukiwali się w nim przyczyny (i/lub w nielosowym pobraniu prób oraz istnieniu struktury populacji) uzyskania takiego wyniku (Forbes i Boyd 1997, Lucchini i in. 2004, Roy i in. 1994). W przypadku badanych kolonii przypuszczenie, że osobniki należą do różnych subpopulacji/populacji nie wydaje się sensowne, jako że próby pochodziły z kolonii macierzystych. W związku z tym efekt Wahlunda (istnienia struktury w próbie) można odrzucić. Stwierdzony w koloniach wysoki stopień inbredu, jak również duży udział imigrantów (wyniki testu przypisania), wydają się najbardziej prawdopodobnymi przyczynami stwierdzonych sprzężeń.

W przypadku wykorzystanych w tym opracowaniu markerów mikrosatelitarnych, nie było niestety dostępnych informacji, na jakich chromosomach są one zlokalizowane, nie można więc żadnych ze sprzężeń definitywnie wykluczyć. Przede wszystkim jednak brak konsekwencji w występowaniu sprzężonych par (Tab. 5 i 6) w poszczególnych koloniach, jak również wykazana intensywna migracja

między koloniami oraz dodatni współczynnik inbredu we wszystkich koloniach, a także potencjalna możliwość zakłóceń w losowości pobranych prób (pochodziły one z kolonii macierzystych, i w paru przypadkach osobniki były rzeczywiście nieco bardziej spokrewnione niż w całej populacji) wskazują, że otrzymane wyniki mogą być artefaktem. Dlatego nie zdecydowano się na usunięcie żadnego z badanych loci z przeprowadzonych analiz.

W niniejszej pracy dla obu gatunków karlików uzyskano znacząco inny zakres długości alleli dla locus Ppip05 niż ten przedstawiony w pracy Racey'a i in. (2007). W przypadku badanych gatunków długości alleli mieściły się w przedziale 168–192 pz dla karlika malutkiego i 170–198 pz dla karlika drobnego, a w pracy Racey'a i in. (2007) było to odpowiednio: 128–154 pz oraz 130–168 pz. Ponieważ różnica ta występuje u obu gatunków, jest mało prawdopodobne by była ona wynikiem różnic między badanymi w obu pracach populacjami. Przyczyny należy dopatrywać się w metodyce. Racey in. (2007) podają, że przyłączanie starterów Ppip05 odbywało się w temperaturze 48°C, podczas gdy w przypadku niniejszej pracy było to 61°C. Dla niższej temperatury przyłączania starterów (55°C; gdy przeprowadzano powtórki) obserwowano liczne dodatkowe piki (tzw. piki duchy), poprzedzające te właściwe i utrudniające odczyt wyników. Przy temperaturze 48°C odczyt ten był potencjalnie jeszcze trudniejszy i mógł prowadzić do niepoprawnego rozróżnienia pików właściwych od pików duchów.

RÓWNOWAGA HARDY'EGO-WEINBERGA

Populacje obu gatunków nie znajdowały się w równowadze H-W. Brak równowagi w kierunku deficytu heterozygot wykazany został dla wszystkich kolonii powyżej pięciu osobników badanych gatunków i dla wszystkich loci z wyjątkiem locus Ppip02. W przypadku karlika malutkiego dla tego locus nie można było odrzucić hipotezy o równowadze H-W, natomiast w przypadku karlika drobnego nie można było odrzucić ani hipotezy o równowadze, ani o deficycie heterozygot.

Przyczyn, dla których populacja odbiega od równowagi H-W może być wiele, między innymi: nielosowe krzyżowanie się osobników, wpływ mutacji lub migracji, mała liczebność populacji. Przede wszystkim należy jednak sprawdzić, czy stwierdzony brak równowagi nie jest artefaktem i nie wynika ze złego doboru markerów — powinny

być one neutralne pod względem selekcji i nie powinny w nich występować allele zerowe.

Założenie, że na siedem z ośmiu wybranych markerów mikrosatelitarnych działa selekcja naturalna jest mało prawdopodobne. Natomiast, rzeczywiście, jak już to wcześniej opisano, przypuszczalnie w markerach tych występowały allele zerowe. Frekwencja stwierdzonych alleli zerowych nie była jednak wysoka, a wprowadzenie poprawki dla alleli zerowych wpłynęło marginalnie na wyniki testu na równowagę H-W, co skłania do przypuszczenia, że to nie allele zerowe były przyczyną obserwowanego odchylenia.

Bardziej prawdopodobną przyczyną wydaje się kojarzenie wsobne — we wszystkich koloniach, zarówno dla danych oryginalnych, jak i po poprawce dla alleli zerowych, zaobserwowano dodatnie wartości F_{IS} i w większości przypadków oszacowanie to było istotne statystycznie (Tab. 7 i 8). Można by przypuszczać, że wysoki współczynnik wsobności to skutek nielosowego poboru prób, tzn. odłowienia osobników spokrewnionych ze sobą bardziej niż średnia dla populacji. Nie wykazano jednak znacznej dodatniej korelacji między średnim współczynnikiem spokrewniania dla danej kolonii, a jej współczynnikiem inbredu w populacji karlika malutkiego, a u karlika drobnego była ona wręcz ujemna (patrz rozdział: „Spokrewnienie”). Wpływ tego czynnika można zatem uznać za marginalny.

Jednym z założeń, które powinno być spełnione, aby populacja znajdowała się w równowadze H-W, jest to, że wpływ migracji na frekwencję alleli jest pomijalny. Przeprowadzone testy przypisania (patrz rozdział: „Migracja”) wskazują na silnie migracyjny charakter obu gatunków i potencjalnie intensywny przepływ genów między wszystkimi koloniami w obrębie obu gatunków (aby migracja oznaczała przepływ genów, osobnik migrujący musi wziąć udział w rozrodzie). Stosunkowo niskie wartości dystansów genetycznych między koloniami u obu gatunków potwierdzają hipotezę o znacznym przepływie genów między koloniami.

Innym czynnikiem, mogącym wpływać na odchylenie od równowagi H-W, może być biologia rozrodu. U samców *P. pipistrellus sensu lato* wykazano silny terytorializm i tworzenie haremów (ang. *resource defence polygyny*; Lundberg i Gerell 1986, Gerell-Lundberg i Gerell 1994). U karlika mniejszego stwierdzono zjawisko tokowania (ang. *lek*), czyli popisów wokalnych samców wzdłuż tras przelotów (Sachteleben i von Helvesen 2006). Takie zachowania mogą wpływać na duże

zróźnicowanie sukcesu rozrodczego samców, a tym samym odchylenie od założenia o losowości krzyżowania.

Jako częstą przyczynę odchylenia od H-W, podaje się efekt Wahlunda, czyli pobrania prób z więcej niż jednej populacji (wówczas proporcja homozygot będzie większa niż byłaby dla każdej populacji osobno). Efekt ten mógłby mieć miejsce w przypadku oceny heterozygotyczności całych populacji, ale w przypadku poszczególnych kolonii macierzystych zjawisko to można całkowicie wykluczyć, a istotna nierównowaga jest obecna nie tylko dla całej populacji, ale dla wszystkich poszczególnych kolonii powyżej pięciu osobników.

Zbyt małe próby mogą wpłynąć na niewłaściwe oszacowanie frekwencji alleli, ale byłoby to wytłumaczeniem w przypadku poszczególnych kolonii poniżej 30–40 osobników, a z pewnością nie dla całych populacji. Ponadto wydaje się mało prawdopodobne, żeby we wszystkich koloniach pojawił się taki sam błąd niedoszacowania liczebności heterozygot.

PODSTAWOWE STATYSTYKI

Pod względem wzoru allelicznego (ang. *allelic pattern*) zaobserwowano jedną istotną statystycznie różnicę pomiędzy gatunkami, a mianowicie brak klasy alleli o frekwencji między 5% a 25% u karlika malutkiego (Ryc. 3 i 4). Ze względu na brak zasadniczych różnic dla innych klas alleli można to interpretować jako nieco większy udział alleli pospolitych (powyżej 50%) w koloniach karlika malutkiego, co mogłoby świadczyć o większej wymianie genów między koloniami. Z drugiej jednak strony udział alleli unikatowych wydaje się nieco wyższy w koloniach karlika malutkiego — wprawdzie najwyższa średnia liczba alleli unikatowych została stwierdzona w Lubni (kolonii karlika drobnego), ale dla pozostałych kolonii była wyższa w koloniach karlika malutkiego. Ponadto kolonia z Lubni wydawała się swoim charakterem odstawać od pozostałych kolonii karlika drobnego, co zostało szerzej przedyskutowane w podrozdziale dotyczącym wyników analizy SAMOVA oraz testu przypisania. W populacji karlika malutkiego odnotowano 35 osobników z jednym lub więcej allelem unikatowym, a w przypadku karlika drobnego 22 takie osobniki. To z kolei sugeruje większy przepływ genów między koloniami karlika drobnego.

W koloniach obu gatunków odnotowano dodatnie wartości współczynnika wsobności F_{IS} , zarówno dla prób oryginalnych, jak i dla tych z uwzględnieniem

poprawki dla alleli zerowych. W koloniach karlika malutkiego wartości współczynnika wsobności mieściły się w zakresie 0,05–0,25 (0,01–0,15 po poprawce dla alleli zerowych) i dla wszystkich kolonii, oprócz najmniej licznych: Nowolesia, Mylina i Siemysławic, dodatnie wartości F_{IS} były istotne statystycznie (Tab. 7). W koloniach karlika drobnego współczynnik wsobności F_{IS} przyjmował nieco wyższe wartości 0,19–0,44 (0,01–0,15), przy czym najwyższa istotna wartość wynosiła 0,28 (Tab. 8). Wyniki te są o tyle zaskakujące, że wysoki współczynnik wsobności dotyczy z reguły niedużych i izolowanych populacji. Oszacowania liczebności karlików dla obszaru Polski nie były przeprowadzane, ale oba gatunki uważane są za jedne z najpospolitszych eupalearktycznych gatunków nietoperzy. Wyniki testu przypisania wskazują na duży stopień migracyjności badanych gatunków. Słabo zaznaczona struktura (wyniki analiz PCoordA, SAMOVA, niewielkie dystanse genetyczne między koloniami) potwierdza hipotezę, że migracje te związane są z przepływem genów. Z drugiej strony, stwierdzono także dodatnią autokorelację dla mniejszych klas odległości u obu gatunków oraz izolację przez dystans w przypadku populacji karlika drobnego. Uzyskane niezgodności w obrazie stopnia przepływu genów w populacjach badanych gatunków mogą być wynikiem odmiennych zachowań samic i samców — filopatryi tych pierwszych i dużego stopnia dyspersji tych drugich. Takie zjawisko było sugerowane dla karlików malutkiego i drobnego (w koloniach rozrodczych, obok samic, stwierdza się zazwyczaj tylko juwenilne samce; patrz też: Thompson 1992), a stwierdzone u innych gatunków nietoperzy strefy umiarkowanej, przykładowo: u nocka Bechsteina (Kerth i in. 2002 a i b, Kerth i Petit 2005), nocka dużego (Castella i in. 2001), czy borowca wielkiego (Petit i Mayer 2000). Zjawisko migracyjności zależnej od płci (ang. *sex biased dispersal*) jest u karlików bardzo prawdopodobne — samice wychowujące młode będą bardziej zależne od dobrych żerowisk i tym samym skłonne do pozostania w miejscu urodzenia, podczas gdy ryzyko migracji będzie dla samców mniejsze. Potwierdzenie tej hipotezy byłoby możliwe poprzez porównanie markerów dwurodzicielskich i jednorodzielskich (fragmentu sekwencji *mtDNA* lub chromosomu Y); o różnicy w dyspersji można by też pośrednio wnioskować na podstawie samych markerów dwurodzicielskich, porównując różnice w indeksie przypisania, współczynniku spokrewnienia, ogólnym współczynniku wsobności i indeksie utrwalenia (test na migracyjność zależną od płci, ang. *test for sex biased dispersal*; Goudet i in. 2002). Kluczowym problemem jest tutaj jednak pozyskanie dostatecznej liczby prób od dorosłych samców, które tworzą większe

zgrupowania jedynie w przypadku kolonii zimowych. W tym opracowaniu struktura płciowa i wiekowa odłowionych nietoperzy nie pozwoliła na przeprowadzenie takiego testu.

ZRÓŻNICOWANIE FREKWENCJI ALLELI I DYSTANS GENETYCZNY — PORÓWNANIE GATUNKÓW

Test na zróżnicowanie kolonii pod względem frekwencji alleli wykazał nieco większe zróżnicowanie kolonii karlika malutkiego niż karlika drobnego. Odpowiednio dla 24% i 14% porównań między koloniami różnica ta była istotna. Z kolei w przypadku dystansu genetycznego F_{ST} (Tab. 11 i 12) oraz standardowego dystansu Nei (Tab. 16 i 17) dla porównań między koloniami, zakres różnic między parami kolonii był nieco większy w przypadku karlika drobnego niż karlika malutkiego — odpowiednio do 0,167 (0,170 po poprawce dla alleli zerowych) i 0,070 (0,061) oraz 0,50 i 0,75 (po poprawce dla alleli zerowych analogicznie). Średnia wartość F_{ST} dla porównań parami u karlika drobnego była także wyższa, ale u obu gatunków odchylenie standardowe było bardzo wysokie — $0,033 \pm 0,032$ versus $0,026 \pm 0,017$ ($0,032 \pm 0,033$ versus $0,025 \pm 0,018$ po poprawce dla alleli zerowych). Ponadto tylko niewielka część porównań była istotna statystycznie: 17% (25% po uwzględnieniu poprawki dla alleli zerowych) dla karlika drobnego i 33% (29%) dla karlika malutkiego. Średnia wartość F_{ST} dla par kolonii różniących się istotnie statystycznie była także nieco wyższa u karlika drobnego, ale już tylko nieznacznie — $0,024 \pm 0,008$ ($0,018 \pm 0,005$ po poprawce dla alleli zerowych), niż u karlika malutkiego — odpowiednio $0,018 \pm 0,005$ ($0,012 \pm 0,003$). Średnia wartość D_S Nei wynosiła dla karlika drobnego $0,20 \pm 0,18$, a dla malutkiego $0,18 \pm 0,13$ (dla danych po poprawce dla alleli zerowych wartości te były takie same). Przedstawione porównania pokazują, że nie ma wyraźnej różnicy między gatunkami pod względem dystansów genetycznych pomiędzy koloniami. Tendencja w stronę nieco wyższych wartości F_{ST} oraz D_S Nei dla par kolonii u karlika drobnego nie wydaje się znacząca, nie tylko z powodu znacznych odchyleń standardowych w przypadku wyliczonych wartości, ale także w świetle wyników testu na zróżnicowanie (wskazujących na nieco większe zróżnicowanie kolonii karlika malutkiego), oraz przy porównaniu miary dystansu, opartej na założeniach modelu mutacji krokowej (R_{ST}). W przypadku R_{ST} zakres dystansów był nieco wyższy dla karlika malutkiego niż drobnego, podobnie jak i średnia dla par kolonii — $0,06 \pm 0,09$ versus $0,02 \pm 0,06$. Wyniki te zresztą też są obciążone dużym marginesem błędów, jako

że dla karlika malutkiego tylko 10% porównań między parami kolonii było istotnych statystycznie, a dla karlika drobnego — 21%.

Brak widocznych różnic między gatunkami jest także wyraźny w przypadku oszacowań, przeprowadzonych nie dla par kolonii, ale także dla populacji badanych gatunków jako całości. Współczynniki F_{ST} i R_{ST} dla całych populacji badanych gatunków przyjmowały zbliżone wartości. Współczynnik F_{ST} był wprawdzie nawet dwukrotnie niższy dla karlika drobnego — od 0,003 do 0,008 w zależności od przyjętych założeń (Tab. 18–20), a od 0,013 do 0,014 dla populacji karlika malutkiego, ale różnice między gatunkami nie były istotne statystycznie i obie wartości były niskie. Z kolei w przypadku współczynnika R_{ST} był on wyższy dla populacji karlika drobnego (0,032 versus 0,010), ale i ta różnica nie była znacząca (Tab. 21, porównaj wartości odchylenia standardowego).

Wyniki te są zgodne z badaniami Bryi i in. (2009) nad populacjami karlików malutkiego i drobnego przeprowadzonych dla kolonii głównie z obszaru Czech i Słowacji (dodatkowo Polska — trzy kolonie, Niemcy i Ukraina — po jednej kolonii). W badaniach tych stwierdzono bardzo niskie wartości całkowitego F_{ST}^{ENA} u obu gatunków i brak różnic między nimi — 0,0051 (95% przedział ufności 0,0031–0,0074) dla populacji karlika malutkiego oraz 0,0053 (0,0030–0,0085). Średnie F_{ST}^{ENA} dla par kolonii karlika malutkiego wyniosło $0,005 \pm 0,004$ (maksymalna wartość 0,015), a dla karlika drobnego $0,006 \pm 0,005$ (0,017). Jak już wcześniej wspomiano, Bryja i in. (2009) swoje badania przeprowadzili z zastosowaniem pięciu takich samych markerów genetycznych, jak w poniższym opracowaniu, że zatem ich wyniki i wyniki z niniejszej pracy można uznać w dużym stopniu za kompatybilne. Pewną różnicę stanowi natomiast zastosowanie przez autorów współczynnika F_{ST}^{ENA} (program *FreeNA*; Chapouis i Estoup 2007), będącego jednak odpowiednikiem zastosowanego w niniejszej pracy F_{ST} , ale z uwzględnieniem specjalnej poprawki dla alleli zerowych. Zatem należy uznać, że uzyskane przez Bryję i in. (2009) wartości powinny być porównywane z wynikami z niniejszego opracowania dla prób z uwzględnioną poprawką dla alleli zerowych. W niniejszym opracowaniu i w pracy Bryi i in. (2009) wykorzystano także te same próby z kolonii z Białowieży i z nad Jeziora Pisocznego. Określona w tej pracy wartość dystansu F_{ST} dla tych kolonii to 0,007 i wartość ta mieści się w zakresie podanych wartości F_{ST}^{ENA} (Bryja i in. 2009) co stanowi pewne (choć oczywiście niewystarczające) potwierdzenie podobieństwa między F_{ST} i F_{ST}^{ENA} . Niestety w pracy Bryi i in. (2009) nie ma informacji o wielkości dystansów

genetycznych pomiędzy poszczególnymi parami kolonii, co pozwoliłoby na przeprowadzenie dodatkowych porównań.

Rzetelne porównanie otrzymanych wyników z tymi uzyskanymi przez Racey'a i in. (2007), zajmujących się genetyką populacyjną karlika malutkiego i drobnego w Wielkiej Brytanii i części Europy kontynentalnej, nie jest niestety możliwe. Wspomniani autorzy nie przeprowadzili oszacowań F_{ST} dla całych badanych populacji. Podali oni jedynie średnie wartości dla porównań par kolonii, co niestety nie daje pełnej informacji o indeksie utrwalenia dla całej populacji i jest obarczone większym ryzykiem błędu losowego, szczególnie, że przebadane przez nich próby nie były równoliczne i nie było ich tyle samo dla obu gatunków. Zatem, zamiast średniego F_{ST} odpowiadającego średniej ważonej (w niniejszym opracowaniu F_{ST} całkowite), do celów porównawczych dysponujemy jedynie średnim F_{ST} dla par kolonii, odpowiadającym średniej nieważonej. Ponadto w przypadku porównań tych średnich autorzy nie przeprowadzili analizy istotności statystycznej różnic między jednym a drugim gatunkiem.

Dla kolonii badanych gatunków z Wysp Brytyjskich Racey in. (2007) stwierdzili średnią wartość F_{ST} dla karlika malutkiego — $0,029 \pm 0,004$ (przy czym druga liczba oznacza tutaj błąd standardowy, SE, a nie odchylenie standardowe, SD; wnioskując z danych zamieszczonych w pracy ww. autorów SD wyniosłoby 0,018) i $0,023 \pm 0,008$ (SD przypuszczalnie 0,047) dla karlika drobnego; zakres wartości odpowiednio $<0,001-0,116$ i $<0,001-0,084$. Po uwzględnieniu kolonii z Europy kontynentalnej wyniki dla takiego porównania wykazały dwukrotnie wyższe wartości F_{ST} dla par kolonii karlika malutkiego — $0,044 \pm 0,007$ (SD przypuszczalnie 0,040) versus $0,024 \pm 0,007$ (SD przypuszczalnie 0,049); zakres wartości odpowiednio $<0,001-0,238$ i $<0,001-0,105$. Powyższe wartości, wbrew wnioskowi wysnutym przez autorów, przy tak dużych odchyleniach standardowych, niekoniecznie świadczą o istotnej różnicy pomiędzy kryptycznymi gatunkami. Test statystyczny pozwalający określić istotność na podstawie parametrów rozkładu (ang. *F and T test from parameters* z programu Past — Hammer i in. 2001), może nie do końca uprawniony ze względu na założenie o rozkładzie normalnym, ale z braku znajomości poszczególnych wartości jedyny możliwy, wykazał, że nie można przyjąć hipotezy o różnicy między średnimi na poziomie 5% ani dla populacji brytyjskich karlików ($p = 0,5$), ani dla populacji brytyjskich razem z próbami z Europy kontynentalnej ($p = 0,06$), choć rzeczywiście w tym drugim przypadku różnica jest marginalnie nieistotna.

Porównanie średnich wartości F_{ST} dla par kolonii uzyskanych przez Racey'a i in. (2007) z tymi uzyskanymi przez Bryję i in. (2009) mogłoby świadczyć o mniejszym zróżnicowaniu genetycznym populacji karlików malutkiego i drobnego w kontynentalnej Europie w porównaniu z populacją z Wysp Brytyjskich. Taki zresztą wniosek, poparty także negatywnym wynikiem testu na izolację przez dystans (a nieznaczną, choć istotną izolację przez dystans sugerują Racey i in. 2007) wysnuli Bryja i in. (2009). Sądząc jednak po uzyskanych w pracy Racey'a i in. (2007) rozrzucie wartości średniego F_{ST} dla par kolonii obu gatunków wartości całkowitego F_{ST} dla badanych przez nich populacji mogłyby być zbliżone do tych z niniejszej pracy oraz pracy Bryi i in. (2009).

Podsumowując, zakres wartości F_{ST} dla par kolonii określony w niniejszej pracy zawierał się właściwie między podanymi w obu porównywanych pracach, natomiast sama średnia bliższa była tej określonej dla populacji z Wysp Brytyjskich z pracy Racey'a i in. (2009) — porównanie to nie jest jednak specjalnie znaczące, bo wariancja w obrębie kolonii była na tyle wysoka, że średnie te nie są dobrym parametrem opisującym populację. Natomiast, co ważne i znacznie mniej obciążone błędem, to fakt uzyskania bardzo zbliżonych wartości całkowitego F_{ST} dla badanych przez Bryję i in. (2007) populacji z Europy kontynentalnej — zarówno populacje karlika malutkiego, jak i drobnego cechuje niska wartość F_{ST} i pod tym względem gatunki te nie różnią się istotnie od siebie. Jednak, populacje obu tych gatunków nie są panmiktyczne, co potwierdziły rezultaty testu na zróżnicowanie pod względem frekwencji alleli (G-test) zarówno w trakcie niniejszego opracowania, jak i w przypadku badań Bryi i in. (2009), w których uzyskane wartości prawdopodobieństwa były analogiczne ($p < 0,001$). Świadczą o tym także nie bardzo liczne, ale istotne statystycznie różnice między koloniami dla F_{ST} i R_{ST} , a także wyniki testu na autokorelację dystansu genetycznego jako funkcji odległości geograficznej u obu gatunków oraz wykazana izolacja przez dystans u karlika drobnego.

MIGRACJE

W przypadku obu gatunków, zarówno wyniki testu przypisania, jak i testu na obecność migrantów w pierwszym pokoleniu, wskazują na wysoki stopień migracyjności i brak ograniczeń co do kierunku migracji. Być może tylko dla karlika drobnego można pokusić się o stwierdzenie mniej intensywnej migracji (a także przepływu genów) między położoną najbliżej Morza Bałtyckiego kolonią z Lubni

a pozostałymi koloniami — testy przypisania wskazują na mały udział migrantów (brak migrantów w pierwszym pokoleniu); ograniczony przepływ genów potwierdza, że kolonię tą w największej liczbie przypadków dzielił też istotny statystycznie dystans genetyczny od pozostałych kolonii (Tab. 12 i 14), a także liczba unikatowych alleli była największa spośród zaobserwowanych dla wszystkich kolonii. W większości kolonii obu gatunków (oczywiście tych, w których liczba osobników nie była mniejsza od liczby kolonii) stwierdzono obecność imigrantów ze wszystkich pozostałych kolonii (Tab. 22 i 23). U karlika malutkiego (Tab. 22) liczba osobników przypisanych do kolonii, w której zostały złapane, dla większych kolonii była zbliżona do połowy próby (od 42% do 62%). Natomiast w przypadku karlika drobnego udział takich osobników, z wyjątkiem kolonii z Lubni (60%), nie przekraczał 37%. Większy udział osobników przypisanych do kolonii, nie będącej miejscem ich schwytania, u karlika drobnego (57%) niż u karlika malutkiego (73%), wskazuje na bardziej migracyjny charakter tego pierwszego gatunku w Polsce.

U obu gatunków wartości prawdopodobieństwa, z jakimi można było przypisać osobniki do kolonii, często także w przypadku przypisań do kolonii będącej miejscem złowienia, z reguły nie były wysokie. Obrazuje to wartość wskaźnika jakości wynosząca 27% dla karlika malutkiego i 17% dla karlika drobnego. Wskazuje to na prawdopodobny brak prób z prawdziwych populacji źródłowych dla badanych osobników. Dodatkowo potwierdza to też wynik testu dla migrantów w pierwszym pokoleniu, gdzie przede wszystkim mamy do czynienia z pojedynczymi migracjami i brakiem migracji krzyżowych. Wyjątek stanowi tutaj para kolonii z Łysomic i Krzyża Wielkopolskiego, pomiędzy którymi prawdopodobnie istnieje intensywny przepływ osobników. Wartość testu przypisania to 15 imigrantów (dwóch w pierwszym pokoleniu) z Łysomic do Krzyża i pięciu (dwóch w pierwszym pokoleniu) imigrantów z Krzyża do Łysomic, przy czym procentowo wielkość przepływu migrantów w obie strony jest zbliżona ze względu na trzykrotnie większą próbę z Krzyża Wielkopolskiego. Hipotezę o migracji między tymi koloniami potwierdzają też obserwacje poczynione podczas pobierania prób od zwierząt z Łysomic — trzy osobniki miały zabliźnione ślady wyglądające jak po biopsji, a trzy miesiące wcześniej pobierano próby w kolonii z Krzyża Wielkopolskiego. Jak już wspomniano, kolonia z Krzyża Wielkopolskiego była kolonią zimową, jest też oddalona od kolonii z Łysomic o niecałe 180 km, więc scenariusz, że osobniki z tej kolonii przeleciały do kolonii rozrodczej w Łysomicach, jest bardzo prawdopodobny. Uzyskane wyniki wskazują

także na przemieszczanie się osobników między kolonią z Krzyża Wielkopolskiego a koloniami z południa — 22% (Tab. 22) osobników przypisanych do kolonii z Krzyża pochodziło z kolonii ze Stolca.

Warto zwrócić uwagę, że duża konserwatywność testu na migrantów w pierwszym pokoleniu (wymaga przypisania osobnika do innej grupy z prawdopodobieństwem 0,99) może sprawić, że w przypadku niewielkich różnic we frekwencji alleli między koloniami jego wyniki mogą być zaniżone — w takiej sytuacji osobnik będący imigrantem niekoniecznie będzie się aż tak znacząco różnił od pozostałych osobników z kolonii. W populacjach obu gatunków frekwencje alleli we wszystkich koloniach były zbliżone (Ryc. 3 i 4), średnia liczba alleli unikatowych także nie była wysoka. Podobieństwo badanych kolonii znalazło również odbicie w niewielkich wartościach dystansów genetycznych. Można zatem przypuszczać, że otrzymane wyniki testu na migrantów w pierwszym pokoleniu są niedoszacowane.

Liczba imigrantów w pierwszym pokoleniu była zbliżona u obu gatunków — 14 osobników w populacji karlika malutkiego oraz 13 w populacji karlika drobnego. Wynik ten nie wydaje się być zgodny z wnioskiem o większej migracyjności karlika drobnego, wysnutym na podstawie wyników testu przypisania. Jednak w przypadku karlika malutkiego jedna z kolonii (Krzyż Wielkopolski) była kolonią zimową, a nie letnią, a jako taka przypuszczalnie stanowiła zgromadzenie nietoperzy z różnych kolonii macierzystych (tak jest np. u borowca wielkiego — Petit i Mayer 2000); również u karlika malutkiego kolonie zimowe są z reguły znacznie liczniejsze niż letnie, a odnotowywano kolonie liczące ponad 30 tysięcy osobników (Nagy i Szántó 2003). To właśnie w kolonii z Krzyża Wielkopolskiego stwierdzono największą grupę emigrantów z pierwszego pokolenia (Ryc. 13).

U raczej osiadłego nietoperza, podkowca dużego, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774), wartości F_{ST} między parami kolonii określone na podstawie 6 loci mikrosatelitarnych, mieściły się w zakresie $<0,01-0,17$ (odległości między koloniami do 75 km), a dla szerszego przedziału odległości geograficznej (284–1898 km), dla takiej samej liczby markerów, zakres wartości wyniósł $<0,09-0,36$ (Rossiter i in. 2000). U migracyjnego nocka dużego zakres ten, oszacowany również na podstawie 6 loci mikrosatelitarnych zawierał się między $<0,01-0,01$ przy przedziale odległości pomiędzy badanymi koloniami 130–580 km (Castella i in. 2000). Zakres wartości uzyskany w niniejszym opracowaniu to $<0,01-0,07$ (dla przedziału odległości 7–420 km) w przypadku karlika malutkiego oraz $<0,01-0,17$ (50–480 km) dla karlika

drobnego. Zatem wyniki te wskazywałyby na pośredni charakter migracyjności karlików w stosunku do wymienionych gatunków nietoperzy — może nie tak osiadły jak u podkowca dużego (wartości zbliżone, ale dla szerszego przedziału odległości lub niższe, przy czym tutaj z kolei przedział odległości dla podkowca był nieco większy), ale też nie tak migracyjny jak u nocka dużego (szczególnie dla karlika drobnego wartości były znacznie wyższe). Warto jednak zauważyć, że po uwzględnieniu tylko istotnych statystycznie wyników F_{ST} dla par kolonii zakres wartości dystansów między koloniami karlika malutkiego zmieniał się na 0,01–0,03 (<0,01–0,02 po poprawce dla alleli zerowych), a dla drobnego na <0,01–0,03 (0,01–0,02 po poprawce dla alleli zerowych); zatem wyniki te są znacznie bardziej zbliżone do tych uzyskanych dla nocka dużego (także zaprezentowanych przez Bryję i in. (2009) dla karlików z Czech i Słowacji). W połączeniu z wynikami testu przypisania może to wskazywać na migracyjny charakter obu gatunków w Polsce. Oczywiście nie należy zapominać, że sam zakres wartości F_{ST} dla par kolonii niekoniecznie jest bardzo dobrym wskaźnikiem pozwalającym wnioskować o migracyjności danego gatunku. Poza wspomnianym już czynnikiem losowym (widocznym chociażby w prezentowanych w niniejszej pracy danych przy porównaniu zakresu istotnych kontra wszystkie wartości F_{ST} ; porównaj też poprzedni podrozdział — F_{ST} całkowite) na wartość odległości genetycznej między koloniami może mieć wpływ nie tylko stopień migracyjności gatunku. Przykładem tego są badania Burland i in. (1999) przeprowadzone na gacku brunatnym *Plecotus auritus* — gatunku, u którego stwierdzono duży stopień osiadłości, w tym filopatrię zarówno samców, jak i samic (na podstawie obrączkowań i innych badań o charakterze niemolekularnym), natomiast zakres dystansu genetycznego między koloniami tego gatunku, oddalonymi od siebie nie więcej niż o 100 km, wyniósł zaledwie <0,01–0,05. Nietoperze mają złożony system zachowań rozrodczych i u osiadłych gacków brunatnych do rozrodu może dochodzić w czasie rojeń (Furmankiewicz i Altringham 2007), co zapewnia zwiększony przepływ genów.

Dodatkowy problem w ocenie stopnia migracyjności stanowi, wspomniana już wcześniej, możliwość zróżnicowanej skłonności do dyspersji samic i samców. Jest to powszechne zjawisko u ssaków (także u wielu gatunków nietoperzy, gdzie często samice odznaczają się silniejszą filopatrią od samców), jak również i innych grup zwierząt. Podczas analizy badanych prób udało się także przypadkowo wykazać filopatrię jednej z samic. Była to samica z kolonii z Przeworna, gdzie przeprowadzano powtórne odłowy, ponieważ za pierwszym razem odłowiono tam zbyt mało nietoperzy.

Jeden osobnik okazał się identyczny pod względem wszystkich analizowanych loci w obu próbach (oczywiście próba ta została usunięta z dalszych analiz).

Ponadto w przypadku karlików wpływ na zróżnicowanie genetyczne mogą mieć dwa zjawiska: wędrówki sezonowe oraz migracja młodych osobników (np. z takich powodów jak przegęszczenie w populacji, presja pasożytów i itp.). Kluczowym pytaniem jest także to, czy w czasie sezonowych wędrówek karlików dochodzi do przepływu genów — czy odbywają się one już po godach. W pracy Bryi i in. (2009) te dwie hipotezy potencjalnego przepływu genów (lub ich połączenie, co wydaje się prawdopodobne) są dyskutowane, ale autorzy nie dochodzą do definitywnych rozstrzygnięć. Nie pozwalają na to też wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Odpowiedzi na te pytania należałoby szukać w koloniach zimowych, które niestety są mało znane zarówno w Polsce (w przypadku karlika drobnego stwierdzenia były sporadyczne i dotyczyły pojedynczych osobników), jak i w wielu innych częściach Europy (Anděra i Hanák 2002, Bryja i in. 2009). Liczba kolonii z okresu hibernacji może także pośrednio dostarczyć informacji o występowaniu sezonowych migracji. Na podstawie stwierdzeń liczby zimowisk przyjmuje się, że w południowo-zachodniej Europie większość populacji karlików jest osiadłych, a nietoperze przemieszczają się między koloniami letnimi i zimowymi na odległość 10–50 km, natomiast w północnej i wschodniej części zasięgu, gdzie zimy są surowsze, gatunki te są wędrowne (Ciechanowski i Szkudlarek 2005). Na podstawie danych z obrączkowań Hutterer i in. (2005) określili karlika malutkiego jako regionalnego migranta.

Wspomniany już przykład kolonii z Łysomic wskazuje na osiadły charakter polskiej części populacji karlika malutkiego, przy czym odnotowany dystans między kolonią letnią a zimową był nieco większy niż wspomniany w poprzednim paragrafie i wynosił 180 km. Zatem można przypuszczać, że dla badanej populacji karlika malutkiego źródłem zróżnicowania genetycznego będzie raczej migracja. Z kolei to, że tak rzadko i nielicznie odnotowuje się hibernujące w Polsce karliki drobne (Ciechanowski i Szkudlarek 2005), skłania do przypuszczeń, że zwierzęta z obszaru Polski biorą udział w sezonowych wędrówkach, co nie musi, ale może mieć wpływ na większy przepływ genów i tym samym mniejsze zróżnicowanie genetyczne. To, że w tych samych warunkach klimatycznych karlik drobny miałby charakter wędrowny, a malutki nie, może być uwarunkowane wielkością zwierząt — karlik drobny jest gatunkiem o nieco mniejszych rozmiarach ciała. Z kolei można się spodziewać, że ze względu na większe wymagania środowiskowe (Davidson-Watts i in. 2006, Vaughan

i in. 1997) karlik drobnego może cechować mniejsza migracyjność samców i/lub silniejsza filopatria samic; co mogłoby tłumaczyć stwierdzony brak (a nawet pewną tendencję do wyższego zróżnicowania genetycznego kolonii karlika drobnego) różnic między gatunkami.

STRUKTURA POPULACJI

U obu gatunków struktura jest słabo zaznaczona, ale dla żadnego z nich nie można przyjąć założenia o całkowitej panmiksji. U karlika malutkiego wprawdzie nie wykazano istotnej izolacji przez dystans (uzyskane wyniki testu Mantela były nieistotne statystycznie), ale wyniki testu autokorelacji sugerują istotną dodatnią korelację dystansu genetycznego jako funkcji odległości dla klasy najmniejszych odległości (0–100 km; Ryc. 11). Podobnie test na zróżnicowanie kolonii pod względem frekwencji alleli oraz miary dystansów genetycznych (F_{ST} i R_{ST}) wskazały na istnienie niedużych, ale istotnych różnic między niektórymi z par kolonii (Tab. 9, 11, i 13). W populacji karlika drobnego zaobserwowano istotną i stosunkowo wysoką (około 0,5) izolację przez dystans (dla różnych miar dystansu — Ryc. 5, 6 i 7), natomiast test autokorelacji pozwolił na odrzucenie hipotezy o panmiksji — podobnie jak u karlika malutkiego korelacja była dodatnia dla klasy najmniejszych odległości (Ryc. 12). Test na zróżnicowanie kolonii pod względem frekwencji alleli oraz miary dystansów genetycznych (F_{ST} i R_{ST}) ujawniły istnienie istotnych różnic między niektórymi z par kolonii (Tab. 10, 12, i 14).

Kształt wykresu analizy autokorelacji dla obu gatunków jest bardzo zbliżony (Ryc. 11 i 12) i można go przypuszczalnie interpretować w następujący sposób: dodatnia korelacja obserwowana dla najmniejszych klas odległości obrazuje większą bliskość genetyczną osobników z mało oddalonych od siebie kolonii. Następnie dla dwóch kolejnych klas intensywny przepływ genów sprawia, że struktura zaciera się, a wartości autokorelacji są nawet nieco niższe niż spodziewane dla modelu panmiktycznego z 95% przedziałem ufności (co można tłumaczyć efektem dryfu genetycznego). Z kolei przy największej klasie odległości intensywność przepływu genów nieco spada i wartość autokorelacji ponownie wzrasta. Przypuszczalnie, gdyby dysponowano próbami z bardziej odległych rejonów geograficznych, wzrost ten utrzymywałby się aż do uzyskania dodatnich wartości autokorelacji. Taki model odpowiada uzyskanemu we wspomianej już pracy dotyczącej populacji wilka

z północno-wschodniej Europy (Pilot 2005). W badaniach tych stwierdzono dodatnią autokorelację dla najmniejszej i największej klasy odległości (przy czym skala badania była większa: od 300 km do 3200 km), podczas gdy dla klas pośrednich korelacja była ujemna i populacja była panmiktyczna. Wykazana dla populacji karlika drobnego izolacja przez dystans prawdopodobnie jest wynikiem właśnie tej małej i wielkoskalowej struktury.

Struktura populacji karlika drobnego wydaje się nieco bardziej zaznaczona niż w przypadku karlika malutkiego (u pierwszego z gatunków wykazano izolację przez dystans), pomimo wyników testu przypisana świadcząca o większej migracyjności karlika drobnego. Być może jednak problem stanowiła tutaj wielkość próby — w przypadku karlika malutkiego była to minimalna wielkość próby wymagana dla testu Mantela, a uzyskane wyniki nie wykluczają izolacji przez dystans. Rzeczywiście, w pracy Racey'a i in. (2007) izolacja przez dystans wykazana została u obu gatunków karlików zarówno dla prób pochodzących tylko z Wielkiej Brytanii, jak i dla tych prób wraz z próbami z Europy kontynentalnej. Dla karlika malutkiego współczynnik korelacji między zlinearyzowanym dystansem genetycznym a logarytmem odległości geograficznej wynosił odpowiednio 0,3 ($p < 0,01$) i 0,16 ($p < 0,05$), natomiast dla karlika drobnego 0,23 ($p < 0,001$) i 0,28 ($p < 0,001$). Zatem wartość korelacji była nieco mniejsza dla karlika drobnego niż obserwowana w tej pracy (0,5). Z kolei w pracy Bryi i in. (2009) nie potwierdzono izolacji przez dystans u badanych gatunków nietoperzy.

Wyniki analiz PCoordA oraz SAMOVA, poszukujących grup strukturalnych w obrębie badanych kolonii, pokazały, że u obu gatunków mamy do czynienia ze słabo zaznaczoną strukturą. Wyniki analizy głównych współrzędnych wskazują jedynie na podział kolonii między gatunkami (Ryc. 8, 9 i 10). Co ciekawe, pewna część osobników jednego i drugiego gatunku nie została właściwie przypisana do swojego gatunku. Mogą one stanowić interesujący materiał do analizy zjawiska hybrydyzacji (próby badania hybryd przy pomocy testu prążków po zastosowaniu enzymów restrykcyjnych zostały nawet podjęte, ale z przyczyn metodologicznych nie powiodły się).

W przypadku analizy SAMOVA podziały na coraz to większą liczbę jednostek prowadziły do kolejnego wyodrębniania poszczególnych kolonii; nawet kolonie zlokalizowane w bezpośrednim sąsiedztwie, jak w przypadku karlika malutkiego kolonie z Nowolesia, Przeworna i Stolca nie zostały wyłączone w odrębną grupę, chociaż test autokorelacji pokazał, że dla klasy najmniejszych odległości (0–100 km) struktura nie jest losowa. Jedynie wzrost zróżnicowania względem podziału na gatunki

między koloniami po odłączeniu kolonii z Nowolesia i Lubni, może wskazywać na odrębny charakter tych kolonii, co w przypadku obu kolonii (szczególnie wyraźnie dla Lubni) potwierdzają wartości dystansów genetycznych między koloniami oraz wyniki testu na zróżnicowanie populacji (Tab. 9–14). Odrębność kolonii z Lubni od pozostałych kolonii karlika drobnego potwierdza także brak stwierdzonych migrantów w pierwszym pokoleniu, najwyższy procent przypisanych osobników do miejsca złowienia (60%) oraz najwyższa stwierdzona frekwencja alleli unikatowych. Kolonia z Lubni była najbardziej wysunięta w kierunku południowym z badanych kolonii karlika drobnego i najbardziej zbliżona do Morza Bałtyckiego (Ryc. 14). Być może właśnie jej skrajna lokalizacja i bliskość do potencjalnej bariery geograficznej sprawiły, że przepływ genów w jej kierunku był ograniczony.

Analiza SAMOVA, podobnie jak PCoordA, jednoznacznie pokazała międzygatunkowy podział badanych kolonii. Taki podział zgodnie z przynależnością gatunkową był najlepszym (tzn. minimalizującym wariancję wewnątrz grupową) ze wskazanych przez procedurę SAMOVA. W zależności od zastosowanego rodzaju analizy wariancji molekularnej (AMOVA F_{ST} -like lub ANOVA R_{ST} -like) zróżnicowanie między gatunkami określone zostało odpowiednio na poziomie 4,5% i 18,9%. Tak wysoki poziom rozbieżności między uzyskanymi rezultatami nie jest zaskakujący: przykładowo w badaniach nad populacjami kanaryjki niebieskoplamej (*Gallotia galloti*) z Wysp Kanaryjskich, opartych na pięciu dinukleotydowych markerach mikrostatelitarnych, AMOVA F_{ST} -like wykazała 11,2% zróżnicowania między populacjami z poszczególnych wysp, a AMOVA R_{ST} -like 24,3% (Richard i Thorpe 2001). Pozostaje dyskusyjnym, która wartość jest bliższa rzeczywistej różnicy. W programie SAMOVA dla loci mikrostatelitarnych autorzy, jako domyślną do analiz loci mikrostatelitarnych, stosują metodę AMOVA R_{ST} -like (Dupanloup i in. 2002). Niezależnie od poziomu różnic wyniki obu analiz AMOVA wskazują jednak na wyraźny (istotny statystycznie) rozdział między badanymi gatunkami kryptycznymi. Chociaż nawet, jeśli słuszne jest przyjęcie założenia o 18,9% różnicy między gatunkami, jak widać chociażby na przykładzie wspomnianych badań nad kanaryjką niebieskoplamą, nie jest to różnica bardzo wysoka — taki poziom zróżnicowania może dotyczyć jednego gatunku.

EFEKTYWNA WIELKOŚĆ POPULACJI

Międzynarodowa Unia Ochrony Przyrody i Jej Zasobów (ICUN), jako jeden z podstawowych wskaźników dla oceny statusu danego gatunku, wykorzystuje wielkość populacji. Wielkość populacji wpływa na wszelkie podstawowe cechy genetyki populacji; dlatego też jest jednym z głównych przedmiotów zainteresowań genetyki populacyjnej, przede wszystkim chodzi o liczbę osobników, która wpływa na różnicowanie genetyczne danej populacji (bierze udział w rozrodzie), czyli efektywną wielkość populacji (N_e). Wartość tego parametru będzie decydować o tym, w jakim tempie zmniejszać się będzie zmienność genetyczna pod wpływem działania losowych zmian frekwencji alleli — dryfu genetycznego.

W pracy przeglądowej Frankham (1995) podaje, że ograniczenie efektywnej wielkości populacji z powodu wahań liczebności jest powszechnym zjawiskiem w przypadku wielu taksonów i szacuje je na 65%. Wahania cenzusowej wielkości danej populacji mogą bardzo znacząco wpłynąć na efektywną wielkość populacji, bo odpowiada ona średniej harmoniczej z dotychczasowych cenzusowych wielkości populacji (Wright 1969). Dlatego tak ważne dla oceny statusu populacji jest oszacowanie N_e oraz ocena, czy populacja nie przeszła przez gwałtowny spadek liczebności, tzw. „szyjkę od butelki” — nawet z pozoru nie tak wielkie wahania cenzusowej wielkości populacji mogą mieć duży wpływ na obniżenie N_e . Warto zauważyć, że niedawny spadek liczebności nie znajdzie odbicia w wartości oszacowania N_e , ale przypadku populacji odbudowującej liczebność po niedawnym przejściu przez „szyjkę od butelki” wartość N_e może być obniżona przez parę pokoleń (Waples 2006).

W przypadku kolonii obu kryptycznych gatunków stwierdzono w teście Wilcoxona istotny statystycznie nadmiar heterozygotyczności (w tym przypadku jej nadmiar w stosunku do liczby alleli; Cornuet i Luikart 1996), świadczący o przejściu badanych kolonii przez „szyjkę od butelki”. W przypadku pięciu kolonii karlika drobnego przejście przez „szyjkę od butelki” potwierdził także test na przesunięcie kształtu krzywej frekwencji alleli. Dla kolonii zgrupowanych jako całość efekt przejścia przez „szyjkę od butelki” był mniej wyraźny, tzn. u obu gatunków dla danych oryginalnych prawdopodobieństwo braku przejścia przez szyjkę było wyższe niż dla poszczególnych kolonii, ale pozwalające na odrzucenie hipotezy zerowej, a dla danych po poprawce na allele zerowe było ono wyższe niż przyjęty 5% poziom istotności. To,

że dla całości populacji efekt przejścia przez „szyjkę od butelki” nie jest tak wyraźny, jak dla poszczególnych kolonii, nie wydaje się zaskakujące. Można się tutaj posłużyć analogią do modelu metapopulacji i wpływu spadku liczebności w poszczególnych subpopulacjach na oszacowanie N_e dla całości populacji. Jednak sam fakt stwierdzenia skutków załamania się liczebności we wszystkich badanych koloniach jest bardzo zaskakujący. Oba gatunki karlików uważane są za pospolite i szeroko rozprzestrzenione w Europie. Jako jedyne z gatunków nietoperzy zamieszkujących Europę nie zostały zaliczone do gatunków ściśle chronionych i objętych II załącznikiem Konwencji Berneńskiej (Ciechanowski i Sachanowicz 2005, Hutson i in. 2001). Uważa się, że są w dużym stopniu synantropijne, a ich kryjówki związane są przede wszystkim z siedzibami ludzkimi (Ciechanowski i Sachanowicz 2005). Nie powinny one być tak wrażliwe na deforestację i fragmentację środowiska, jak na przykład związany z dziuplami starych drzew nocek Bechsteina. Tymczasem otrzymane rezultaty są bardzo zbliżone do wyników badań nad koloniami nocka Bechsteina z Wielkiej Brytanii, gatunku o większych wymogach środowiskowych (Durrant i in. 2008). Na siedem badanych tam kolonii nocka dla sześciu wykazano efekt „szyjki od butelki” przy zastosowaniu tej samej procedury obliczeniowej, co w niniejszej pracy (efekt potwierdziły wyniki testu Wilcozona, a dla czterech kolonii stwierdzono także przesunięcie kształtu krzywej obrazującej frekwencje alleli). Podobnie jak w prezentowanych przeze mnie badaniach stwierdzono także dodatnie i podobne wartości inbrodu dla badanych kolonii. Oszacowany poziom prawdopodobieństwa (od 0,002 do 0,010) dla hipotezy o braku przejścia populacji przez „szyjkę od butelki” był zbliżony do przedstawionego w niniejszym opracowaniu (0,002 do 0,039; dla ośmiu kolonii $p \leq 0,006$).

Poza stwierdzeniem przejścia populacji przez gwałtowne załamanie liczebności, interesujące jest także stwierdzenie, kiedy to zjawisko miało miejsce. W przypadku wykorzystania do takich obliczeń wysoko polimorficznych loci mikrosatelitarnych przyjmuje się, że mamy do czynienia ze zjawiskami niedawnymi w skali ewolucyjnej (Cornuet i Luikart 1996, Luikart i Cornuet 1998). Cornuet i Luikart (1996), na podstawie modeli teoretycznych, ocenili, że przy zastosowaniu procedur z programu Bottleneck dla populacji o efektywnej wielkości 50 osobników ślady przejścia przez „szyjkę od butelki” będą widoczne po 25–250 pokoleniach. Stwierdzone załamanie liczebności mogło mieć zatem miejsce w XX wieku. Rzeczywiście w połowie XX wieku u wielu gatunków nietoperzy obserwowano spadek liczebności, a jako

przypuszczalną przyczynę tego zjawiska podaje się chemizację rolnictwa, a w szczególności stosowanie pestycydów. Spektakularnym przykładem może być udokumentowany spadek liczebności odnotowany w kolonii *Tadarida brasiliensis* w Stanach Zjednoczonych, w której liczebność nietoperzy spadła o 95% (z 8,7 mln do 218 tysięcy osobników), co najprawdopodobniej było to spowodowane zastosowaniem pestycydów na polach, będących żerowiskiem badanej kolonii (Geluso i in. 1976). Bardziej szczegółowe informacje na temat zatruc europejskich gatunków nietoperzy pestycydami, a także przypuszczalnie bardzo dużej wrażliwości karlika malutkiego na środki używane do konserwacji drewna można znaleźć w pracach Lüftla i in. (2005) oraz Shore'a i in. (1996). Spadek liczebności nietoperzy wiązany jest także z postępującą deforestacją i defragmentacją środowiska naturalnego (Mickleburgh i in. 2002, Mitchell-Jones i in. 1986, 1993, Russ i Montgomery 2002, Russo i in. 2002, Stebbings 1995), przy czym akurat w przypadku obu gatunków karlików, które często bytują w siedzibach ludzkich, ten drugi czynnik nie wydaje się aż tak znaczący.

W świetle wyników świadczących o przejściu kolonii badanych gatunków przez drastyczne spadki liczebności jeszcze ciekawszym zagadnieniem stało się oszacowanie efektywnej wielkości populacji. Niestety uzyskane rezultaty nie były jednoznaczne. Wyniki, otrzymane przy zastosowaniu procedury obliczeniowej z programu NeEstimator (Peel i in. 2004), bardzo różnią się od tych z programu *LDNE* (Waples i Do 2008). W przypadku pierwszego z programów oszacowane wartości efektywnej wielkości populacji były podobne do spodziewanych dla poszczególnych kolonii (tylko dwa oszacowania dla karlika drobnego były nieokreślone, bo górną granicą przedziału ufności stanowiła nieskończoność). Liczebności cenzusowe badanych kolonii były szacowane pobieżnie, ale większość z otrzymanych wartości *Ne* wydaje się być skorelowana z szacunkowymi cenzusowymi wielkościami danych kolonii — dla kolonii ocenionych jako mniejsze wartości *Ne* były niższe, a dla ocenionych jako większe wyższe. Efektywne wielkości populacji wydają się zbliżone do cenzusowych — stosunek bliski jedności odnotowano na podstawie badań ekologicznych i behawioralnych dla kolonii nocka Bechsteina w Niemczech (Kerth i in. 2002b). Natomiast zaskakując niska okazała się wartość oszacowania dla populacji jako całości. W przypadku karlika malutkiego było to 229 osobników (196,4; 257,6) dla oryginalnej próby i 243 (212,4; 282,5) dla próby z odtworzonymi allelami zerowymi, a dla karlika drobnego odpowiednio: 115 (105,8; 125,4) i 128 (118; 140,4). Wynik ten jest w zgodzie z uzyskanymi dowodami na przejście badanych

populacji karlików przez „szyjkę od butelki”, ale wydaje się bardzo niski, szczególnie gdy weźmie się pod uwagę spodziewaną cenzusową wielkość populacji. Wielkość ta w przypadku badanych gatunków w Polsce nie jest wprawdzie znana, niemniej jednak np. dla Wielkiej Brytanii (oszacowania na podstawie pięcioletniego monitoringu) populację karlika malutkiego oceniono na około 2–2,5 miliona osobników, a karlika drobnego 1–1,5 miliona (Bat Conservation Trust 2006, Battersby 2005). Uwzględniając fakt, że rozkład prób nie był równomierny (Ryc. 2) i że przeprowadzone oszacowanie nie dotyczyło całkowitego obszaru Polski oraz że pod względem demograficznym populacje z Europy kontynentalnej mogą się różnić od tej z Wielkiej Brytanii, i tak wydaje się, że założenie o cenzusowej wielkości populacji badanych gatunków rzędu kilkuset tysięcy osobników jest bardzo ostrożne. Oznaczałoby to, że stosunek N_e do cenzusowej wielkości populacji wynosi około 10^{-3} , co jest wartością bardzo niską, choć odnotowywaną już w naturalnych populacjach (Hedrick 2005; porównaj także: Frankham 1995, Waples 2002) — spektakularnym przykładem może być małża (*Crassostrea gigas*), u której stosunek ten oszacowano na mniej niż 10^{-6} (Hedgecock i in. 1992). Wiadomo, że wyniki oszacowania N_e mogą być zaniżone wówczas, gdy próba pobrana z populacji jest znacząco niższa niż wielkość rzeczywistej efektywnej wielkości (England i in. 2006, Waples 2008), co może mieć miejsce w przypadku przypuszczalnie tak licznie występujących zwierząt jak nietoperze. Na podstawie symulacji komputerowych Waples (2008) stwierdził, że niedoszacowanie N_e występuje już wtedy, gdy pobrana próba jest mniejsza niż dwukrotność rzeczywistego N_e ; gdy próba jest mniejsza od N_e , błąd staje się znaczący, a w przypadku, gdy próba stanowi mniej niż 0,1 rzeczywistej N_e , uzyskany wynik może już stanowić niewielki ułamek poszukiwanej wartości.

Chociaż oszacowana wartość N_e dla badanych gatunków może być zaniżona, warto zwrócić uwagę, że z badań nad populacjami karlików z Wielkiej Brytanii wynika, że na jednego karlika drobnego przypadają średnio dwa karliki malutkie i taka też jest proporcja uzyskanych w niniejszej pracy efektywnych wielkości populacji.

Z kolei wyniki oszacowania przeprowadzonego w programie *LDNE* albo dały wyniki negatywne, albo granicą przedziału ufności dla wyznaczonych wartości była nieskończoność. Negatywny wynik oszacowania efektywnej wielkości populacji może być interpretowany na dwa sposoby. W pierwszym przypadku można uznać, że otrzymaną wartość należy interpretować jako nieskończoność. To oznacza, że N_e jest liczbą bardzo wysoką i nie ma żadnego dowodu, który świadczyłby o nierównowadze

wywołanej przez dryf genetyczny, wynikający ze skończonej liczby rodziców. W drugim przypadku taki wynik sugeruje błąd wynikający z nielosowości próby (Waples i Do 2008). Uzyskane wyniki albo świadczą o błędzie metody, albo o tym, że efektywna wielkość populacji jest bardzo wysoka. Co ciekawe, wyniki oszacowań N_e przeprowadzone tymi samymi programami dla kolonii nocka Bechsteina (Durrant i in. 2008) dały bardzo podobne rezultaty. Obie wymienione przyczyny ujemnego oszacowania N_e wydają się prawdopodobne zarówno w niniejszych badaniach, jak i w tych dotyczących populacji nocka Bechsteina. W obu przypadkach spokrewnienie w próbach przyjmowało wartości dodatnie, także wskaźnik wsobności był wysoki. Jeśli natomiast stosunek N_e do cenzusowej wielkości populacji jest bliski jedności, jak stwierdzono dla kolonii nocka Bechsteina z Niemiec (Kerth i in. 2002b), to nawet dla oszacowań N_e dla poszczególnych kolonii pobrane próby były zbyt małe (jak już wspomniano, dla prób mniejszych niż N_e błąd staje się znaczący). Dodatkowo Waples (2006) w odniesieniu do szacowania N_e na podstawie wysoce polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych stwierdza, że potrzebne jest przeprowadzenie dalszych badań porównawczych, żeby ocenić ich przydatność w takich oszacowaniach.

Kwestia oszacowań N_e jest tematem szeroko dyskutowanym w literaturze i nadal wiele kwestii pozostaje spornych (Beaumont 2003, Berthier i in. 2002, England i in. 2006, Tallmon i in. 2004, Tallmon i in. 2008, Waples 2008). Na podstawie uzyskanych wyników trudno wyciągnąć rozstrzygające wnioski. Jednak stwierdzony istotny efekt „szybki od butelki” u obu badanych gatunków, a także wysokie wskaźniki inbredu dla wielu z badanych kolonii sugerują, że ocena statusu zagrożenia badanych gatunków może być nazbyt optymistyczna. Niewątpliwie rysuje się tutaj potrzeba dalszych badań, tym bardziej, że stosunek efektywnej i cenzusowej wartości populacji jest uznawany za bardzo istotny wskaźnik dla zarządzania zagrożonymi gatunkami (Hedrick 2005). Wielu autorów jako dokładniejszą metodę określania N_e podaje metodę opartą na szacowaniu zmian frekwencji alleli w próbach pobieranych w kolejnych sezonach rozrodczych, co najmniej dwukrotnie z danej populacji (Berthier 2002). Niemniej jednak metoda ta, poza trudnościami technicznymi, też nie jest niestety wolna od wad, np. jej wyniki może zaburzyć imigracja (Beaumont 2003).

Wnioski

1. Potwierdzono, przy zastosowaniu dwóch różnych metod molekularnych, obecność obu kryptycznych gatunków karlika — karlika malutkiego i drobnego w Polsce.
2. Wykazano dużą zmienność genetyczną dla populacji karlików malutkiego i drobnego w Polsce — wartości heterozygotyczności obserwowanej wyniosły odpowiednio: 0,67 i 0,68 (0,78 i 0,75 po uwzględnieniu poprawki dla alleli zerowych).
3. Wykazano odchylenie od równowagi Hardy’ego-Weineberga dla większości (bez najmniej licznych) kolonii obu gatunków, jak i dla kolonii potraktowanych jako całość w obrębie gatunku.
4. U obu gatunków stwierdzono istnienie słabej, ale istotnej struktury populacji.
5. Dla karlika drobnego wykazano istnienie izolacji przez dystans.
6. Stwierdzono silny migracyjny charakter obu gatunków, bardziej zaznaczony u karlika drobnego. Pośrednio wykazano, że migracjom tym towarzyszy przepływ genów, o czym świadczą niskie i często nieistotne wartości dystansu genetycznego pomiędzy koloniami oraz niska wartość wskaźnika utrwalenia (F_{ST}) dla całości populacji.
7. Pod względem indeksu utrwalenia, bogactwa allelicznego, wskaźnika wsobności, spokrewnienia oraz wartości heterozygotyczności spodziewanej i obserwowanej gatunki nie różniły się od siebie istotnie.
8. We wszystkich badanych koloniach (o liczebności powyżej pięciu osobników) obu gatunków stwierdzono efekt przejścia przez „szyjkę od butelki”.
9. U obu gatunków we wszystkich koloniach stwierdzono dodatnie wartości wskaźnika wsobności.

10. Wykazano istnienie osiadłej kolonii (nie podejmującej sezonowej wędrówki) karlika malutkiego. Dystans między kolonią zimową a letnią wynosił 180 km.
11. Na podstawie markerów genetycznych stwierdzono przypadek filopatry u samicy karlika malutkiego.
12. Analizy zmienności molekularnej (AMOVA) oraz głównych współrzędnych (PCoordA), pomimo nakładających się zakresów długości nukleotydowych badanych markerów dla obu kryptycznych gatunków, uwidoczniły wyraźny rozdział międzygatunkowy.
13. Pomimo wykazania, że oba gatunki nie są panmiktyczne nie wyodrębniono żadnych wyższych jednostek strukturalnych niż kolonie, a i pomiędzy koloniami nie zawsze istniały wyraźne podziały.

Literatura

Anděra M. i Hanák V. (2007) Atlas of mammals of the Czech Republic — a provisional version. V Bats (Chiroptera). Muzeum Narodowe, Praga.

Arlettaz R., Godat S., Meyer H. (2002) Competition for food by expanding pipistrelle bat populations (*Pipistrellus pipistrellus*) might contribute to the decline of lesser horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*). *Biological Conservation* **93**: 55–60.

Avery M. I. (1991) Pipistrelle, w: Corbet G. B., Harris S. (red.) Handbook of British mammals. Blackwell Publications, Oxford: 124–128.

Barlow K. E. i Jones G. (1999) Roosts, echolocation calls and wing morphology of two phonic types of the *Pipistrellus pipistrellus*. *Zeitschrift für Säugetierkunde* **64**: 257–268.

Barratt E. M., Deaville R., Burland T. M., Bruford M. W., Jones G., Racey P. A., Wayne R. K. (1997) DNA answers the call of pipistrelle bat species. *Nature* **97**: 138–139.

Barratt E. M., Bruford M. W., Burland T. M., Jones G., Racey P. A., Wayne R. K. (1995) Characterization of mitochondrial DNA variability within the microchiropteran genus *Pipistrellus*: approaches and applications. *Symposia of the Zoological Society of London* **67**: 377–386.

Bartonička T., Bielik A., Řehák Z. (2008) Roosts switching and activity patterns in the soprano pipistrelle, *Pipistrellus pygmaeus*, during lactation. *Annales Zoologici Fennici* **45**: 503–512.

Bat Conservation Trust (2006) The National Bat Monitoring Programme Annual Report 2005. (www.bats.org.uk)

Battersby J. (red.) (2005) Tracking Mammals Partnership. UK Mammals: Species Status and Population Trends. JNCC/Tracking Mammals Partnership (www.trackingmammals.org).

Beaumont M. A. (2003) Estimation of population growth or decline in genetically monitored populations. *Genetics* **133**: 1139–1160.

Beck N., Peakall R., Heinsohn R. (2008) Social constraint and an absence of sex-biased dispersal drive fine-scale genetic structure in white-winged choughs. *Molecular Ecology* **17**: 4346–4358.

Benda P., Hulva P., Gaisler J. (2004) Systematic status of African populations of *Pipistrellus pipistrellus* complex (Chiroptera: Vespertilionidae, with a description of a new species from Cyrenaica, Libya. *Acta Chiropterologica* **6**: 193–217.

Benda P., Ivanova T., Horáček I., Hanák V., Èervený J., Gaisler J., Gueorguieva A., Petrov B., Vohralík V. (2003) Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean. Part 3. Review of bat distribution in Bulgaria. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* **67**: 245–357.

Berthier P., Beaumont M. A. Cornuet J. M., Luikart G. (2002) Likelihood-based estimation of effective population size using temporal changes in allele frequencies: a genealogical approach. *Genetics* **160**: 741–751.

Bogdanowicz W. (2004). *Pipistrellus kuhlii* (Kuhl, 1817) — Weissrandfledermaus, w: Krapp, F.(red.) Handbuch der Säugetiere Europas. Band 4: Fledertiere. Teil II: Chiroptera II. Aula-Verlag, Wiebelsheim: 875–908.

Brookfield J. F. Y. (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency, *Molecular Ecology* **5**: 453–455.

Bryja J., Kaňuch P., Fornuskova A., Bartonička T., Řehák Z. (2009) Low population genetic structuring of two cryptic bat species suggests their migratory behaviour in continental Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **96**: 103–114.

Burland T. M., Barratt E. M., Beaumont M. A., Racey P. A. (1999). Population genetic structure and gene flow in a gleaning bat, *Plecotus auritus*. *Proceedings of Royal Society Ecology* **266**: 975–980.

Burland T. M., Barratt E. M., Nichols R. A., Racey P. A. (2001). Mating patterns, relatedness and the basis of natal philopatry in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*. *Molecular Ecology* **10**: 1309–1321.

Burland T. M., Worthington-Wilmer J. (2001) Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. *Biological Reviews* **76**: 389–409.

Castella V., Ruedi M., Excoffier L., Ibanez C., Arlettaz R., Hausser J. (2000). Is the Gibraltar Strait a barrier to gene flow to the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)? *Molecular Ecology* **9**: 1761–1772.

Castella V., Ruedi M., Excoffier L. (2001) Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 708–720.

Chapuis M. P., Estoup A. (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 621–631.

Coombs J. A., Letcher B. H., Nislow K. H. (2007) CREATE 1.0 — Software to create and convert codominant molecular data.
<http://www.lsc.usgs.gov/CAFL/Ecology/Ecology/html>.

Cornuet J. M. i Luikart G. (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**: 2001–2014.

- Dakin E. E., Avise J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**: 504–509.
- Dallas J. F. (1992). Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome* **3**: 452–456.
- Davidson-Watts I., Walls S., Jones G. (2006) Differential habitat selection by *Pipistrellus pipistrellus* and *Pipistrellus pygmaeus* identifies distinct conservation needs for cryptic species of echolocating bats. *Biological Conservation* **133**: 118–127.
- Dietz C., von Helversen O., Nill D. (2007) Handbuch der Fledermäuse Europas und Nordwestafrikas. Kosmos, Stuttgart, 399 s.
- Di Rienzo A., Peterson A. C., Garza J. C., Valdes A. M., Slatkin M., Freimer N. B. (1994) Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 3166–3170.
- Dietz C. i von Helversen O. (2004). Illustrated identification key to the bats of Europe. Electronic publication, version 1.0, Tuebingen, 72 s., www.uni-tuebingen.de/tierphys/Kontakt/mitarbeiter_seiten/dietz.htm.
- Durrant C. J., Beebee T. J. C., Greenaway F., Hill D. A. (2008). Evidence of recent population bottlenecks and inbreeding in British populations of Bechstein's bat, *Myotis bechsteinii*. *Conservation Genetics* **10**: 489–496.
- Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* **11**: 2571–2581.
- Efron B. (1982) Estimating the error rate of a prediction rule: improvement on cross-validation. *Journal of the American Statistical Association* **78**: 316–331.
- England P. R., Cornuet J. M., Berthier P., Tallmon D. A., Luikart G. (2006) Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. *Conservation Genetics* **7**: 303–308.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.
- Feyerabend F. i Simon M. (2000) Use of roosts and roost switching in a summer colony of 45 kHz phonic type pipistrelle bats *Pipistrellus pipistrellus* Schreber, 1774. *Myotis* **38**: 51–59.
- Forbes S. H. i Boyd D. K. (1997) Genetic Structure and Migration in Native and Reintroduced Rocky Mountain wolf populations. *Conservation Biology* **11**: 226–234.
- Frankham R. (1995) Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research* **66**: 95–107.

Furmankiewicz J. i Altringham J. (2007). Genetic structure in a swarming brown long-eared bat (*Plecotus auritus*) population: evidence for mating at swarming sites. *Conservation Genetics* **8**: 913–923.

Gaisler J., Hanák V., Hanzal V., Jarský V. (2003) Výsledky kroužkování netopýřů v České republice a na Slovensku, 1948–2000. *Vespertilio* **7**: 3–61.

Geluso K. N., Attenbach J. S., Wilson D. E. (1978) Bat mortality: pesticide poisoning and migratory stress. *Science* **194**: 184–186.

Gerell-Lundberg K. i Gerell R. (1994) The mating behaviour of the Pipistrelle and the Nathusius' Pipistrelle (Chiroptera) — a comparison. *Folia Zoologica* **43**: 315–324.

Goodnight K. F. i Queller D. C. (2004) Relatedness 5.0 Manual, <http://www.gsoftnet.us/gsoft.html>

Goudet J. (1995) Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity* **86**: 485–486.

Goudet J. (2001) Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995)

Goudet J., Perrin N., Waser P. (2002) Tests for sex-biased dispersal using biparentally inherited genetic markers. *Molecular Ecology* **11**: 1103–1114.

Goudet J., Raymond M., Rousset F. (1996) Testing differentiation in diploid population. *Genetics* **144**: 1933–1940.

Haddow J. F. (1993) Pipistrelle roosts in Central Region. *Scottish Bats* **2**: 18–23.

Hamilton W. D. (1971) Selection of selfish and altruistic behaviour in some extreme models, w: Eisenberg J. F., Dillon W. S. (red.) *Man and Beast: Comparative Social Behavior*. Smithsonian Institute Press, Washington DC: 57–91.

Hammer Ř., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001) PAST: Palaeobiological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* **4**: 9.

Hall T. (2007) BioEdit 7.09, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

Hardy O. J. i Vekemans X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**: 618–620.

Hartl D. L. i Clark G. C. (1997) *Principles of Population Genetics*. Third ed., Sinauer Associates, Saderland, Massachusetts, 530 s.

Häussler U., Nagel A., Braun M., Arnold A. (2000) External characters discriminating sibling species of European pipistrelles, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) and *P. pygmaeus* (Leach, 1825). *Myotis* **37**: 27–40.

Hedgecock D., Chow V., Waples R. S. (1992) Effective population numbers of shellfish broodstocks estimated from temporal variance in allelic frequencies. *Aquaculture* **108**: 215–232.

Hedrick P. W. (2005) Large variance in reproductive success and the N_e/N ratio. *Evolution* **59**: 1596–1599.

Hill W. G. (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research* **38**: 209–216.

Hulva P., Benda P., Hanák V., Evin A., Horáček I. (2007) New mitochondrial lineages within the *Pipistrellus pipistrellus* complex from Mediterranean Europe. *Folia Zoologica* **56**: 378–388.

Hulva P., Horáček I., Strelkov P. P., Benda P. (2004) Molecular architecture of *Pipistrellus pipistrellus*/*Pipistrellus pygmaeus* complex (Chiroptera: Vespertilionidae): further cryptic species and Mediterranean origin of the divergence *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 1023–1035.

Hutson A. M., Mickleburgh S. P., Racey P. A. (2001) Global status survey and conservation action plan for Microchiropteran bats. IUCN, Cambridge, 258 s.

Hutterer R., Ivanova T., Meyer-Cords C., Rodrigues L. (2005) Bat migrations in Europe. A review of banding data and literature. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn: 180 s.

Kaňuch P., Hájková P., Řehák Z., Bryja J. (2007) A rapid PCR-based test for species identification of two cryptic bats *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus* and its application on museum and dropping samples. *Acta Chiropterologica* **9**: 277–282.

Karlsson B. L., Eklöf J., Rydell J. (2002) No lunar phobia in swarming insectivorous bats (family Vespertilionidae) *Journal of Zoology, London* **256**: 473–477.

Kiefer A., Mayer F., Kosuch J., von Helversen O., Veith M. (2002) Conflicting molecular phylogenies of European long-eared bats (*Plecotus*) can be explained by cryptic diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **25**: 557–556.

Kiefer A. i Veith M. (2002) A new species of long-eared bat from Europe (Chiroptera: Vespertilionidae). *Myotis* **39**: 5–16.

Kepka O. (1981) Fledermäuse der Steiermark. *Myotis, Bonn* **18–19**: 168–179.

Kerth G. i König B. (1999) Fission, fusion and nonrandom associations in female Bechstein's bats (*Myotis bechsteinii*). *Behaviour* **136**: 1187–1202.

Kerth G. i Petit E. (2005) Colonization and dispersal in a social species, the Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology* **14**: 3943–3950.

Kerth G., Mayer F., Petit E. (2002a) Extreme sex-biased dispersal in the communally breeding, nonmigratory Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology* **11**: 1491–1498.

Kerth G., Safi K., König B. (2002b) Mean colony relatedness is a poor predictor of colony structure and female philopatry in communally breeding Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **52**: 203–210.

Kimura M. i Crow J. F. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **48**: 725–738.

Kimura M. i Ohta T. (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 2868–2872.

Kulzer E. (1988) Bats, w: Grzimek B. (red.) Grzimek's Encyclopedia Mammals Vol. 1. Mc Graw-Hill Publishing Company, Nowy Jork: 536–631.

Kunz T. H. i Fenton M. B. (red.) (2003) Bat ecology. The University Chicago Press, Chicago, 779 s.

Li W. H. (1997) Molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA., 489 s.

Lucchini V., Fabbri E., Marucco F., Ricci S., Boitani L., Randi E. (2002) Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology* **11**: 857–868.

Luikart G. i Cornuet J. M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* **12**: 228–237.

Lüftl S., Freitag B., Deutz A., Steineck T., Tataruch F. (2005) Concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in the liver of European bats (Microchiroptera). *Fresenius Environmental Bulletin* **14**: 167–172

Lundberg K. i Garell R. (1986) Territorial advertisement and mate attraction in the bat *Pipistrellus pipistrellus*. *Ethology* **71**: 115–124.

Mayer F. i von Helversen O. (2001a). Sympatric distribution of cryptic bat species across Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **74**: 365–374.

Mayer F. i von Helversen O. (2001b): Cryptic diversity in European bats *Proceedings of Royal Society, London B* **268**: 1825–1832.

Mayer F., Dietz C., Kiefer A. (2007) Molecular species identification boosts bat diversity. *Frontiers in Zoology* **4**: 1–5.

Mayer F., Schlötterer C. i Tautz D. (2000) Polymorphic microsatellite loci in vespertilionid bats isolated from the noctule bat *Nyctalus noctula*. *Molecular Ecology* **9**: 2208–2212.

Michalakis Y. i Excoffier L. (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics* **142**: 1061–1064.

Mickleburgh S., Hutson A., Racey P. (2002) A review of the global conservation status of bats. *Oryx* **36**: 18–34.

Miller-Butterworth C. M., Jacobs D. S., Harley E. H. (2002) Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in Schreiber's long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Molecular Ecology Notes* **2**: 139–141.

Miller-Butterworth C. M., Jacobs D. S., Harley E. H. (2003) Strong population substructure is correlated with morphology and ecology in a migratory bat. *Nature* **424**: 187–191.

Mitchell-Jones A. J., Amori G., Bogdanowicz W., Krystufek B., Reinjders P. J. H., Spitzenberger F., Stubbe M., Thissen J. B. M., Vohralik V., Zima J. (red.) (1999) The atlas of European mammals. Academic Press, London, 484 s.

Mitchell-Jones A. J., Jefferies D. J., Stebbings R. E., Arnold H. R. (1986) Public concern about bats (Chiroptera) in Britain UK: An analysis of enquiries in 1982–1983. *Biological Conservation* **36**: 315–328.

Mitchell-Jones A. J., Hutson A. M., Racey P. A. (1993) The growth and development of bat conservation in Britain. *Mammal Society* **23**: 139–148.

Mucedda M., Kiefer A., Pidinchedda E., Veith M. (2002) A new species of long-eared bat (Chiroptera, Vespertilionidae) from Sardinia (Italy). *Acta Chiropterologica* **4**: 121–135.

Nagy Z. i Szántó L. (2003) The occurrence of hibernating *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) in caves of the Carpathian Basin. *Acta Chiropterologica* **5**: 155–160.

Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583–590.

Norberg U. M. i Rayner J. M. (1987) Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* **316**: 335–427.

Paetkau D. i Strobeck C. (1995) The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology* **4**: 519–520.

Paetkau D., Waits L. P., Clarkson P. L., Craighead L., Strobeck C. (1997). An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics* **147**: 1943–1957.

Paetkau D., Slade R., Burden M., Estoup A. (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* **13**: 55–65.

Papadatou E., Butlin R. K., Altringham J. D. (2008) Identification of bat species in Greece from their echolocation calls. *Acta Chiropterologica*. **10**: 127–143.

Park K. J., Altringham J. D., Jones G. (1996) Assortative roosting in the two phonic types of *Pipistrellus pipistrellus* during the mating season. *Proceedings of Royal Society B* **263**: 1495–1499.

Peakall R. i Smouse P.E. (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288–295.

Peakall R. i Smouse P.E. (2007) GenAlEx 6.1 — Appendix 1 — Methods and Statistics <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>

Peakall R., Smouse P.E., Huff D.R. (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD Variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology* **4**: 135–147.

Peel D., Ovenden J. R., Peel S. L. (2004) Neestimator: Software for Estimating Effective Population Size, Version 1.3. Department of Primary Industries and Fisheries, Queensland Government.

www.dpi.qld.gov.au/cps/rde/dpi/hs.xsl/28_6908_ENA_HTML.htm

Petit E., Excoffier L. i Mayer F. (1999). No evidence of bottleneck in the postglacial recolonization of Europe by the noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Evolution* **53**: 1247–1258.

Petit E. i Mayer F. (2000) A population genetic analysis of migration: the case of the noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Molecular Ecology* **9**: 683–690.

Piksa K. (2008) Swarming of *Myotis mystacinus* and other bat species at high elevation in the Tatra Mountains, southern Poland. *Acta Chiropterologica* **10**: 69–79.

Pilot M. (2005) Zmienność i struktura genetyczna wilka *Canis lupus* w Europie Środkowo-Wschodniej. Rozprawa doktorska, Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa.

Piry S., Alapetite A., Cornuet J. M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A. (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**: 536–539.

Queller D. C. i Goodnight K. F. (1989): Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**: 258–257.

Racey P. A., Barratt E. M., Burland, T. M., Deaville R., Gotelli D., Jones G., Piertney S. B. (2007) Microsatellite DNA polymorphism confirms reproductive isolation and reveals differences in population genetic structure of cryptic pipistrelle bat species. *Biological Journal of Linnean Society* **90**: 539–550.

Rachwald A. i Szkudlarek R. (2001) Stwierdzenie występowania typów echolokacyjnych „45 kHz” i „55 kHz” karlika malutkiego *Pipistrellus pipistrellus* („gatunki ukryte” *P. piistrellus* i *P. pygmaeus*) na terenie Polski. *Nietoperze* **2**: 19–22.

Raymond M., Rousset F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248–249.

Richard M i Thorpe R. S. (2000) Highly polymorphic microsatellites in the lacertid *Gallotia galloti* from the western Canary Islands. *Molecular Ecology* **9**: 1919–1920.

Rivers N.M., Butlin R. K., Altringham J. D. (2005) Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology* **14**: 4299–4312.

Roer H. (1989) Field experiments about the homming behaviour of the common pipistrelle (*Pipistrellus pipistrellus*, Schreber), w: Hanák V, Horáček I, Gaisler J. (red.). European bat research 1987. Charles University Press, Praha: 551–558.

Rossiter S. J., Jones G., Ransome R. D., Barratt E. M. (2000) Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology* **9**: 1131–1135.

Roy M. S., Geffen E., Smith D., Ostrander E. A., Wayne R. K. (1994) Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Molecular Biology Evolution* **11**: 553–570.

Ruczyński I. i Bogdanowicz W. (2005). Roost cavity selection by *Nyctalus noctula* and *N. leisleri* (Vespertilionidae, Chiroptera) in Białowieża Primeval Forest, eastern Poland. *Journal of Mammalogy* **86**: 921–930.

Ruedi M. i Castella V. (2003) Genetic consequences of the ice ages on nurseries of the bat *Myotis myotis*: a mitochondrial and nuclear survey *Molecular Ecology* **12**: 1527–1540.

Russ J. M. i Montgomery W. I. (2002) Habitat associations of bats in Northern Ireland: implications for conservation. *Biological Conservation* **108**: 49–58.

Russo D., Jones G., Migliozzi A. (2002) Habitat selection by the Mediterranean horseshoe bat, *Rhinolophus euryale* (Chiroptera: Rhinolophidae) in a rural area of southern Italy and implications for conservation. *Biological Conservation* **107**: 71–81.

Sachanowicz K. i Ciechanowski M. (2005) Nietoperze Polski. Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa, 160 s.

Sachanowicz K., Wower A., Bashta A. T. (2006) Further range extension of *Pipistrellus kuhlii* (Kuhl, 1817) in central and eastern Europe. *Acta Chiropterologica* **8**: 543–548.

Sachteleben N. J. i von Helversen O. (2006) Songflight behaviour and mating system of the pipistrelle bat (*Pipistrellus pipistrellus*) in an urban habitat. *Acta Chiropterologica* **8**: 391–401.

Sachteleben J. (1991) Zum 'Invasions' – Verhalten der Zwergfledermaus (*Pipistrellus pipistrellus*). *Nyctalus (NF)* **4**: 51–66.

Shiel C. B. i Fairley J. S. (1999) Evening emergence of two nursery colonies of Leisler's bat (*Nyctalus leisleri*) in Ireland. *Journal of Zoology, London* **247**: 439–447.

Shore R. F., Myhill D. G., Wright J. A. (1996) A comparison of the toxicity to laboratory mice and pipistrelle bats *Pipistrellus pipistrellus* of exposure to remedially-treated timber. *Environmental toxicology and pharmacology* **2**: 125–129.

Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**: 457–462.

Smouse P. E. i Peakall R. (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* **82**: 561–573.

Smouse, P. E., Peakall, R., and Gonzales, E. (2008) A heterogeneity test for fine-scale genetic structure. *Molecular Ecology* **17**: 3389–3400.

Sokal R. R. i Rolf F. J. (1981) Biometry. Second edition. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 859 s.

Stebbing R. E. (1995) Why should bats be protected? A challenge for conservation. *Biological Journal of Linnean Society* **56**: 103–118.

Spitzenberger F., Haring E., Tvrtkovic N. (2002) *Plecotus microdontus* (Mammalia, Vespertilionidae) a new bat species from Austria. *Natura Croatica* **11**: 1–18.

Spitzenberger F., Strelkov P., Haring E. (2003) Morphology and mitochondrial DNA sequence show that *Plecotus alpinus* Kiefer i Veith, 2002 and *Plecotus microdontus* Spitzenberger, 2002 are synonymus of *Plecotus macrobullaris* Kuzjakin, 1965. *Natura Croatica* **12**: 39–53.

StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.

Tallmon D. A., Koyuk A., Luikart G., Beaumont M. A. (2008) ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation *Molecular Ecology Resources* **8**: 299–301.

Tallmon D. A., Luikart G., Beaumont M. A. (2004) Comparative evaluation of a new effective population size estimator based on approximate bayesian computation *Genetics* **167**: 977–988.

Thompson M. J. A. (1992). Roost philopatry in female pipistrelle bats *Pipistrellus pipistrellus*. *Journal of Zoology, London* **228**: 673–679.

van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P.F. (2003) Micro-Checker Version 2.2.3. Department of Biological Sciences and Department of Computer Science, University of Hull.

Vaughan N., Jones G. & Harris S. (1997) Habitat use by bats (Chiroptera) assessed by means of a broad-brand acoustic method. *Journal of Applied Ecology* **34**: 716–730.

Veith M., Beer N., Kiefer A., Johannesen J., Seitz A. (2004) The role of swarming sites for maintaining gene flow in the brown long-eared bat (*Plecotus auritus*). *Heredity* **93**: 342–349.

von Helversen O., Heller K. G., Mayer F., Nemeth A., Volleth M., Gombkötö P. (2001) Cryptic mammalian species: a new species of whiskered bat (*Myotis alcathoe* n. sp.) in Europe. *Naturwissenschaften* **88**: 217–223.

Vonhof M. J., Barber D., Fenton M. B., Strobeck C. (2006) A tale of two siblings: multiple paternity in big brown bats (*Eptesicus fuscus*) demonstrated using microsatellitemarkers. *Molecular Ecology* **15**: 241–247.

Vonhof M. J., Davis C. S., Fenton M. B., Strobeck C. (2002) Characterization of dinucleotide microsatellite loci in big brown bats (*Eptesicus fuscus*), and their use in other North American vespertilionid bats. *Molecular Ecology Notes* **2**: 167–169.

Waples R. S. (2002) Definition and estimation of effective populations size in the conservation of endangered species, w: Beissinger S. R., McCullough D. R. (red.) Population Viability Analysis. University of Chicago Press, Chicago :147–168.

Waples R. S. (2006) A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics* **7**: 167–184.

Waples R. S. i Do C. (2008) LDNE: A program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* **8**: 753–756.

Waser P. M. i Strobeck C. (1998) Genetic signatures of interpopulation dispersals. *Trends in Ecology and Evolution* **13**: 43–44.

Weaver K. N, Alfano S. E, Kronquist A. R., Reeder D. M. (w druku) Healing rates of wing punch wounds in free-ranging little brown myotis (*Myotis lucifugus*). *Acta Chiropterologica*.

Weir B. S. i Cockerham C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358–1370.

Whorthington-Wilmer J. i Barratt E.M. (1996). A non-lethal method of tissue sampling for genetic studies of microchiropterans. *Bat Research News* **37**: 1–3.

Willis C. K. R. i Brigham R. M. (2004) Roost switching, roost sharing and social cohesion: forest-dwelling big brown bats, *Eptesicus fuscus*, conform to the fission-fusion model. *Animal Behaviour* **68**: 495–505.

Wright S. (1969) *Evolution and the Genetics of Population, Vol. 2: The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press, Chicago, 622 s.

Załącznik I

Wykaz stwierdzonych haplotypów

Haplotypy fragmentu (do 484 pz) cytochromu *b* karlika drobnego (H1–H9) i karlika malutkiego (h1–h11) — porównanie z sekwencjami z GeneBanku (oznaczonymi *; o numerach odpowiednio: AJ504442.1, DQ120856.1, DQ120852.1, DQ120851.1).

k. drobnny*	CCCCTAAT - CAAAATTATTAACAGCTCAT - TCATTG ACCTA - CCGA TC - CGT CAAACAT - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
k. drobnny*	CCCCTAAT - CAAAATTATTAACAGCTCAT - TCATTG ACCTA - CCAGCTC - CAT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
H1	CCCCTAATTAACAAAATTATTAACAGCTCATGTCATTG ACCTA - CCAGCTT - CAT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
H2	CCCCTAATTAACAAAATTATTAACAGCTCATGTCATTG ACCTA - CCAGCTC - CAT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
H3	CCCCTAATTAACAAAATTATTAACAGCTCATGTCATTG ACCTA - CCAGCTC - AT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
H4	CCCCTAATTAACAAAATTATTAACAGCTCATGTCATTG ACCTA - CCAGCTT - CAT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
H5	CCCCTAATTAACAAAATTATTAACAGCTCATGTCATTG ACCTA - CCAGCTT - CAT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
H6	CCCCTAATTAACAAAATTATTAACAGCTCATGTCATTG ACCTA - CCAGCTT - CAT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
H7	CCCCTAATTAACAAAATTATTAACAGCTCATGTCATTG ACCTA - CCAGCTT - CAT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
H8	TCCCTAAT - CAAAATTATTAACAGCTCATGTCATTG ACCTA - CCAGCT - CCAT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
H9	CCCCTAATTAACAAAATTATTAACAGCTCATGTCATTG ACCTA - CCAGCTT - CAT CAAACAT - CT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
k. malutki*	CCCCTGAT - CAAAATCATCAATAACTCAT - TCATTG ATCTA - CCAGCTC - CAT CAAACAT - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
k. malutki*	CCCC GATAA ACAATACTCACTAACTCATTGACTTG ATC - G CC GCTTTT T - AAA C T - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
h1	CCCCTGATTAACAAAATCATCAATAACTCATTGCAATGGAATCTAGACCAGCTTTT CAT CAAACATTT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
h2	CCCCTGATTAACAAAATCATCAATAACTCATTGCAATGGAATCTA ACCAGCCTTTT CAT CAAACAT TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
h3	CCCC GATAA ACAATACTCACTAACTCATTGACTTG ATC - G CC GCTTTT T - AAA C T - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
h4	CCCCTGAT - CAAAATCATCAATAACTCAT - TATTG ATCTA - CCAGCTC - CCAT CAAACAT - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
h5	CCCCTGAT - CATCAATAACTCATTGACTTG ATCTA - CCAGCTC - CCAT CAAACAT - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
h6	CCCCTGAT - ACAAAATCATCAATAACTCATTGCAATGGAATCTA - CCAGCTCCTT T - CAAACAT - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
h7	CCCCTGATTAACAAAATCATCAATAACTCATTGCAATGGAATCTA - CCAGCTTTT CAT CAAACAT - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
h8	CCCC GATA - AAAATCATCAATAACTCATTGACTTG ATCTA - CCAGCTC - TAT CAAACAT - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGG
h9	CCCCTGATA - CAAAATCATCAATAACTCATTGCAATGGAATCTA - CCAGCTC - CCAT - AAAACAT - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGGG
h10	CCCCTGAT - CAAAATCATCAATAACTCATTGACTTG ATCTA - CCAGCT - CCAT CAAACAT - TT - CAGCATGATGGAATTTTGGGG
h11	CCCCTGAT - CAAAATCATCAATAACTCATTGACTTG ATCTA - ACCAGCTCTTAT CAAACATTTTCCAGCATGATGGAATTTATAGGG
k. drobnny*	GT CA GACA CAGCAACAGCCTTCAG CT - CTGTCACC CACA - TCTGCCGAGACGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TCTAC
k. drobnny*	GT CA GATA CAGCAACAGCCTTCAG CT - CTGTCACC CACA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TATAC
H1	GT CATGATA CAGCAACAGCCTTCAGACT - CTGTCACC CACA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TCTAC
H2	GT CATGATA CAGCAACAGCCTTCAGACT - CTGTCACC CACA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TCTAC
H3	GT CATGATA CAGCAACAGCCTTCAGACT - CTGTCACC CACA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TCTAC
H4	GT CATGATA CAGCAACAGCCTTCAG CT - ACTGTCACCGCACA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TCTAC
H5	GT CATGATA CAGCAACAGCCTTCAG CT - ACTGTCACCGCACA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TATAC
H6	GT CA GATA CAGCAACAGCCTTCAG CT - CTGTCACC CACA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TCTAC
H7	GT CA GATA CAGCAACAGCCTTCAG CT - CTGTCACC CACA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TCTAC
H8	GT CATGATA CAGCAACAGCCTTCAG CT - ACTGTCACC CAA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TCTAC
H9	GAT A GATA CAGCAACAGCCTTCAGACT - CTGTCACC CACA - TCTGCCGAGATGTA AATTATG GATGAGTCTACGATA - TCTAC
k. malutki*	AT CA GATA CAGCAACAGCCTTCAG CT - CCGTTACT CATA - TCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
k. malutki*	AT CA GACA CAGCAACAGCCTTCAG CT - CCGTTACT CACAGTCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
h1	AT CA GACA CAGCAACCTCCTTCAGACT - CCGTTACT CAC - GTCTGTCGAGATGTA AATTACT GATGAGTCTACGATA - CCTAC
h2	AT CA GACA CAGCAACAGCCTTCAG CT - CCGTTACT CACA - TCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
h3	AT CA GACA CAGCAACAGCCTTCAG CT - CCGTTACT CACAGTCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
h4	AT CA GACA CAGCAACAGCCTTCAG CT - CCGTTACT CACA - TCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
h5	AT CAGTACA CAGCAACAGCCTTCAG CTC - CCGTTACT CACAGTCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
h6	AT CA - TACA CAGCAACCTCCTTCAG CTC - CG TTACT CAC - GTCTGTCGAGATGTA AATTACT - TGATGAGTCTACGATA - CCTAC
h7	AT CA GACA CAGCAACAGCCTTCAG CTC - CG TTACT CACAGTCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
h8	AT CA GACA CAGCAACAGCCTTCAGACT - CC TTACT CAC - GTCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
h9	ATTGAGTACA CAGCAACAGCCTTCAGACT - CCGTTACTGACAGTCTGTCGAGATGTA AATTACT - TGATGAGTCTACGATA - CTAGC
h10	ATTGAGTACA CAGCAACAGCCTTCAGACT - CCGTTACT CACAGTCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
h11	ATTGAGTACAGCAGCAACAGCCTTCAGACT - CACAGTCTGTCGAGATGTA AATTACG GATGAGTCTACGATA - CCTAC
k. drobnny*	T C CTACT TATT - TAAAGA AACCTGAA - ATATAG GAGTTATT TTACT ATT CGCTG TAATA GCAA CG GCC TTCAT
k. drobnny*	T C CTACT TATT - TAAAGA AACCTGAA - ATATAG GAGTTATT TTACT ATT CGCTG TAATA GCAA CG GCC TTCAT
H1	T CACTACT TATTG TAAAGAGAACCTGAA - ATATAGTGAAGTTATGATTACT - ATGATGCTG TAATA GCAA CG GCC TTCAT
H2	T C CTACT TATTG TAAAGA AACCTGAA - ATATAG GAGTTATTACT - ATG CGCTG TAATA GCAA CG GCC TTCAT
H3	T GACTACT TATTG TAAAGAAAACCTGAA - ATATAGTGAAGTTATGATTACT - ATGATGCTG TAATA GCAA CG GCC TTCAT
H4	T C CTACT TATTG TAAAGA AACCTGAA - ATATAG GAGTTATGAT ACT - ATGACGCTG TAATA GCAA CG GCC TTCAT
H5	T CACTACT TATTG TAAAGAAAACCTGAA - ATATAGTGAAGTTATGAT ACT - ATGATGCTG TAATA GCAA G GCC TTCAT
H6	T C CTACT TATT - TAAAGA AACCTGAA - ATATAG GAGTTAT - ATTACT ATT CGCTG TAATA GCAA CG GCC TTCAT
H7	T GACTACT - TAT G TAAAGA AACCTGAA - ATATA TGAGTTATGATTACT - ATGATGCTG TAATA GCAA CG GCC TTCAT
H8	TGCCTACTGTTATTG TAAAGAAAACCTGAA
H9	-----
k. malutki*	T C CTACT TATT - AAAGA AACCTGAA - ACATAG GAGTTATT TTACT ATT TGCTG TGATA GCGA CA GCC TTCAT
k. malutki*	T C CTACT TATT - TATTAGAAAACCTGAA - ACATAGTGAAGTTATGATTACT - ATTGTCGCTG TGATA GCGA CA GCC TTCAT
h1	T C CTACT TAT A TAAAGAAAACCTGAA - ACATA TGAGTTATGATAACT - ATGGTCTGATGATAAAGCGGATCA - CCGCTTACTATAA
h2	T C CTACT TATTACAAA GA AACCTGAA - ACATAG GAGTTATT TTACT - ATTGTCGCTG TGATA GCGA CA GCC TTCAT
h3	T C CTACT TATT - TATTAGAAAACCTGAA - ACATAGTGAAGTTATGATTACT - ATTGTCGCTG TGATA GCGA CA GCC TTCAT
h4	TGCACTACT TATTA TAAAGAAAACCTGAAACATAAAGAGTTATGATTACTGATGATGCTG TGATA GCGACAG - CCGTTCAT - A
h5	T C CTACT TAT A TAAAGAAA CCGTATAACATA - TGAGTTATGATTACT - ATGGTCTGATGATA GCGACAG - CC TTCAT
h6	T C CTACT TATT - AAAGAGAACCTGAA - ACATAAATGAGTTATGATCACT - ATGGTCTGATGATAACCGCGATGATGCGCTTACTATAA
h7	T C CTACTGTTATTA TAAAGAAAACCTGAA - ACATAATGAGTTATGATTACT - ATGGTCTGATGATA GCGACAG - CC TTCAT
h8	T CCTACT TATTA TAAAGAAAACCTGAA - ACATAATGAGTTATGATTACT - ATGGTCTGATGATA GCGACAG - CC TTCAT
h9	-----
h10	-----
h11	-----

Inst. Zool. PAN
Biblioteka

K. 35690