

Muzeum i Instytut Zoologii
Polskiej Akademii Nauk
BIBLIOTEKA

Muzeum i Instytut Zoologii
Polska Akademia Nauk

**Genetyczne zróżnicowanie gacka brunatnego *Plecotus auritus*
(Linnaeus, 1758) w Polsce**

Anna Tereba

Rozprawa doktorska

Wykonana w Muzeum i Instytucie Zoologii

Polskiej Akademii Nauk

Pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Bogdanowicza

Warszawa 2010

Poniższe badania zostały sfinansowane w ramach projektu MNSW N N304 026934

K.35721

Nr opinii 1116

Muzeum i Instytut Zoologii
Polskiej Akademii Nauk
BIBLIOTEKA
K.35721

D.14/10-5

Podziękowania

Za wszelką pomoc oraz udzielenie informacji o technikach odłowu nietoperzy, lokalizacji kolonii letnich i miejscach rojenia się gacków brunatnych dziękuję całej rzeszy polskich chiropterologów: Mateuszowi Ciechanowskiemu, Joannie Furmankiewicz, Krzysztofowi Kasprzykowi, Grzegorzowi Lesińskiemu, Michałowi Piskorskiemu, Tomaszowi Postawie, Ireneuszowi Ruczyńskiemu, Agnieszce Szubert i Grzegorzowi Wojtaszynowi.

Szczególnie podziękować pragnę Korneliuszowi Kurkowi oraz Krzysztofowi Piksie za bezcenną pomoc przy wspólnych odłowach.

Za liczne uwagi dotyczące metod molekularnych oraz genetyki populacyjnej dziękuję współpracownikom z Pracowni Technik Molekularnych i Biometrycznych: Robertowi Rutkowskiemu, Małgorzacie Pilot oraz Marcie Gajewskiej. Dziękuję też pozostałym osobom pracującym w laboratorium za stworzenie miłej atmosfery motywującej do pracy naukowej.

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi Prof. dr hab. Wiesławowi Bogdanowiczowi za opiekę nad pracą, cenne wskazówki i pomoc przy realizacji rozprawy doktorskiej.

STRESZCZENIE.....	7
WSTĘP	8
CEL PRACY.....	17
MATERIAŁ I METODY	18
Zbiór materiału biologicznego.....	18
Opis stanowisk.....	19
Metody laboratoryjne.....	23
Analiza zróżnicowania regionu kontrolnego (HVI) mitochondrialnego DNA	24
Analiza genetycznej struktury populacji gacków brunatnych w Polsce.....	24
Analiza liczby migrantów pomiędzy grupami lokalnymi.....	26
Analiza zróżnicowania genetycznego z uwzględnieniem funkcji ekologicznych stanowisk	27
Analizy filogeograficzna i demograficzna z uwzględnieniem wszystkich haplotypów z Polski	28
Analiza filogenetyczna wszystkich znanych haplotypów HVI gacków brunatnych.....	31
WYNIKI	34
Różnorodność mitochondrialnego DNA w polskiej populacji gacka brunatnego.....	34
Genetyczna struktura populacji gacków brunatnych	36
Analiza stopnia migracji pomiędzy grupami lokalnymi.....	45
Zróżnicowanie genetyczne dla trzech typów stanowisk.....	49
Zależności filogeograficzne i analiza demograficzna krajowej populacji gacka brunatnego	52
Relacje filogenetyczne między haplotypami mtDNA gacków brunatnych z Polski.....	56
Analiza filogenetyczna między znanymi haplotypami mtDNA gacków brunatnych z Europy.....	63
DYSKUSJA.....	69
Ocena poziomu zmienności regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA.....	69

Genetyczna struktura populacji stwierdzona na podstawie analizy mtDNA	71
Ocena poziomu migracji między grupami lokalnymi	73
Relacje filogenetyczne między haplotypami mtDNA gacków brunatnych	74
Filogeografia na podstawie mitochondrialnego markera molekularnego	75
Implikacje dla ochrony gatunku.....	78
WNIOSKI.....	80
LITERATURA.....	82
ZAŁĄCZNIKI.....	96

STRESZCZENIE

Celem pracy była analiza zróżnicowania genetycznego gacków brunatnych, *Plecotus auritus* (Linnaeus, 1758), w Polsce, przeprowadzona na podstawie markera molekularnego, który jest dziedziczony w linii żeńskiej. Zbadano również stopień przepływu genów oraz wpływ czynników historycznych na genetyczną strukturę populacji. Stopień zmienności genetycznej oszacowany został na podstawie sekwencji pierwszej domeny superzmiennej regionu kontrolnego (HVI) mitochondrialnego DNA o długości 343 par zasad, dla 398 osobników. Stwierdzono 120 haplotypów, a uzyskane zróżnicowanie haplotypowe (0.976 ± 0.002) było wysokie. Znaczna liczba haplotypów była unikatowa dla danej lokalizacji; stanowiły one 76,6% (92 haplotypy) wszystkich stwierdzonych haplotypów. Analiza genetycznej struktury populacji wykazała znaczne zróżnicowanie genetyczne w populacji $F_{ST} = 0,39$. Także test Mantela wykazał dodatnią korelację między dystansami genetycznym a geograficznym, co jest zgodne z modelem izolacji przez dystans. Ponadto uzyskano silnie ograniczony przepływ genów związany z bardzo małą liczbą migrujących samic. Analizy filogenetyczne wskazały podział na dwa podstawowe klady. Dla obu z nich jak i dla całej badanej populacji test neutralności F_s wykazał istotne statystycznie odstępstwa (w kierunku ujemnym) od teorii neutralności Kimury; taki wynik jest charakterystyczny dla zjawisk ekspansji. Jest on również zgodny z wynikiem analizy rozkładu różnic nukleotydowych, także potwierdzającym przejście „polskiej” populacja gacków brunatnych przez proces ekspansji. Topologia uzyskanych drzew filogenetycznych, w połączeniu z wynikami testów neutralności, może świadczyć o postglacjalnej kolonizacji obszaru Polski przez dwie odrębne linie ewolucyjne.

Przeprowadzone badania wskazują na niezwykle istotną rolę obszaru Polski, nie tylko z uwagi na bogactwo przyrodnicze, lecz również pod względem biogeograficznym, w aspekcie procesów kolonizacyjnych i ewolucyjnych gacka brunatnego. Uzyskane wyniki, poza oceną struktury genetycznej oraz potwierdzeniem niskiej migracyjności samic, wskazały dwie odrębne jednostki ważne ewolucyjnie (ESU). Gatunek ten jest uważany za jeden z najpospolitszych w Europie jednak w świetle otrzymanych wyników, strategia jego ochrony powinna brać pod uwagę wyznaczone haplogrupy.

WSTĘP

Populację można rozumieć jako grupę organizmów tego samego gatunku zajmujących określony obszar w tym samym czasie (Wilson, 1992) oraz rozmnażających się między sobą (Ayala, 1982). Populacja jest układem dynamicznym zmieniającym się w czasie i przestrzeni. Jedną z dziedzin badających zjawiska zachodzące w populacjach jest genetyka populacyjna, która skupia się m.in. na czynnikach determinujących dobór naturalny, dryfie genetycznym, rekombinacjach, mutacjach oraz przepływie genów (Halliburton, 2004).

Zróżnicowanie genetyczne może być badane na różnych poziomach organizacji przestrzennej. Oprócz zróżnicowania genetycznego między lokalnymi populacjami, może być ono wykazywane w szerszej skali geograficznej np. między krainami geograficznymi. Pewien poziom międzypopulacyjnego zróżnicowania genetycznego obserwuje się u prawie wszystkich gatunków (poza gatunkami rzadkimi i zagrożonymi wymarciem) (Freeland, 2005).

Głównymi czynnikami wpływającymi na kształtowanie się struktury genetycznej są: migracje, losowe efekty dryfu genetycznego, dobór naturalny, dywergencja, rekombinacja genetyczna związana z systemem kojarzeń, przestrzenna struktura środowisk i izolacja przez dystans (Avisé, 2004). Poszczególne czynniki biologiczne w różnym stopniu mogą wpływać na stopień zróżnicowania genetycznego w zależności od gatunku. W przypadku zwierząt, czynnikiem decydującym o stopniu zróżnicowania populacji może być mobilność danego gatunku (Ward i in., 1992). Organizmy o dużych możliwościach dyspersyjnych zazwyczaj wykazują mniejszy stopień zróżnicowania genetycznego niż gatunki bardziej osiadłe (Bohonak, 1999), gdyż wysoka mobilność powinna być związana z intensywniejszą migracją i przepływem genów. Dodatkowo u wielu gatunków intensywność przepływu genów jest odwrotnie proporcjonalna do odległości geograficznej. Zjawisko to określa się mianem izolacji przez dystans, a związane jest to z faktem, że osobniki częściej migrują do miejsc położonych bliżej lokalizacji pierwotnej (np. Avisé, 2004). W analizach dotyczących przepływu genów niezwykle istotną rolę spełnia identyfikacja barier ograniczających migracje. Bariery takie mogą stanowić lokalne ukształtowania terenu,

typu: łańcuchy górskie, zbiorniki wodne oraz fragmentacja środowiska (Freeland, 2005). Oprócz migracyjności na rozmieszczenie gatunku i zróżnicowanie genetyczne, istotny wpływ mogą mieć również czynniki historyczne. Procesy historyczne mające miejsce w przeszłości wpływają nie tylko na geograficzne rozmieszczenie populacji, ale również na zależności filogenetyczne (Avise, 2004). Procesy mikroewolucyjne mają ścisły związek z procesami demograficznymi zachodzącymi w populacjach. Analiza wpływu czynników historycznych na aktualną strukturę genetyczną pozwala na zrozumienie istniejącego zróżnicowania genetycznego w populacji.

Pod względem badań dotyczących zróżnicowania genetycznego, rząd nietoperzy (Chiroptera) wydaje się być wyjątkowo interesującą grupą zwierząt. Wiele cech takich jak: zdolność aktywnego lotu, echolokacja, nocny tryb życia czy hibernacja świadczy o niezwykle ciekawej ewolucji przedstawicieli tego rzędu. Dodatkowym aspektem jest bardzo wysoka różnorodność biologiczna oraz bogactwo gatunków [nietoperze są najliczniejszym, zaraz po gryzoniach, rządem ssaków; znanych jest ponad 1100 gatunków (Simmons, 2005)].

Badania molekularne mogą dotyczyć różnych aspektów ekologii nietoperzy, a wykorzystanie różnych markerów genetycznych daje możliwość analiz na różnych poziomach struktury przestrzennej populacji. Dodatkowo możliwa jest również identyfikacja gatunków kryptycznych, które w obrębie nietoperzy wcale nie należą do rzadkości, np. pary karlików malutkiego (*Pipistrellus pipistrellus*) i drobnego (*Pipistrellus pygmaeus*) (Barratt i in., 1997),nocków Alkathoe (*Myotis alcathoe*) i wąsatka (*Myotis mystacinus*) (Helvesen i in., 2001), gacków alpejskiego (*Plecotus macrobullaris*) i bałkańskiego (*Plecotus kolombatovici*) (Kiefer i in., 2002). Rozwój technik molekularnych daje możliwość wglądu w zróżnicowanie genetyczne wybranych populacji, migrację oraz filogeografię.

W badaniach populacyjnych ssaków zazwyczaj stosuje się dwa typy markerów: jądrowe (dziedziczą się po obu rodzicach) i mitochondrialne (dziedziczone tylko w linii żeńskiej). Markery mikrosatelitarne (jądrowe), charakteryzujące się bardzo szybkim tempem ewolucji, pozwalają na przeprowadzanie analiz na poziomie populacyjnym i osobniczym, jak w przypadku nietoperzy z rodzaju *Cynopterus* (Campbell i in., 2006), Campbell i in. (2006) np. wykazali brak istotnego zróżnicowania genetycznego u *C. brachyotis* choć dane obserwacyjne wskazywały na brak intensywnych przelotów pomiędzy badanymi populacjami. Hipoteza wyjaśniająca brak tego zróżnicowania opiera się na założeniu, że czas jaki upłynął od wylesienia obszaru i fragmentacji

badanych siedlisk jest zbyt krótki, aby zachodzące mutacje różnicujące poszczególne populacje zdążyły się utrwalić. Również często stosowane w badaniach populacyjnych są markery mitochondrialne. Zaletą genomu mitochondrialnego jest szybkie tempo mutacji (około 10 razy szybsze niż genomu jądrowego), brak intronów, oraz konserwatywność wielu fragmentów, co daje możliwość amplifikacji przy wykorzystaniu uniwersalnych starterów do łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Salgueiro i in. (2004), na podstawie sekwencji regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA, analizowali strukturę genetyczną u borowca azorskiego (*Nyctalus azoreum*) na wyspach archipelagu Azory. Cały rodzaj *Nyctalus* jest zaliczany do grupy nietoperzy migrujących. Jednak w przypadku endemicznego *N. azoreum* nie zaobserwowano migracji sezonowych. Salgueiro i in. (2004) wykazali, że połowa stwierdzonych haplotypów była unikatowych dla poszczególnych wysp, a przepływ genów w obrębie archipelagu był bardzo ograniczony.

W związku z możliwością aktywnego lotu i dużą mobilnością nietoperzy można by oczekiwać słabo zarysowanej struktury genetycznej. Migracyjność, która ma głównie wpływ na stopień zróżnicowania genetycznego, u tej grupy zwierząt jest jednak zróżnicowana w zależności od gatunku. Badania z użyciem technik obrączkowania wykazały, że niektóre gatunki nietoperzy z rodzajów *Nyctalus* czy *Pipistrellus* mogą migrować nawet kilka tysięcy kilometrów pomiędzy koloniami letnimi a zimowiskami (np. Petersons, 2004; Hutterer i in., 2005). Natomiast u gatunków osiadłych lub migrujących fakultatywnie przeloty ograniczają się do znacznie krótszych dystansów. Sezonowe przeloty u nocka rudego (*Myotis daubentonii*) średnio wynoszą 100–150 km (Hutterer i in., 2005). Najdłuższy znany przelot u tego gatunku to 304 km (Steffens i in., 2005).

Petit i Mayer (1999) badali poziom zróżnicowania genetycznego między 13 koloniami letnimi borowca wielkiego (*Nyctalus noctula*). Na podstawie analizy ośmiu markerów mikrosatelitarnych uzyskali bardzo niską wartość indeksu utrwalenia ($F_{ST} = 0,05$) pomiędzy badanymi koloniami. Świadczy to o bardzo intensywnym przepływie genów u tego gatunku. Jednak wiele czynników takich jak: bariery geograficzne, czynniki historyczne czy środowiskowe wpływają na kształtowanie się struktury genetycznej oraz ograniczenia przepływu genów między populacjami. Ci sami autorzy (Petit i Mayer, 2000) zauważyli, że kolonie borowca wielkiego z północnej części Europy są częściowo izolowane od pozostałych badanych populacji z południowej i zachodniej części kontynentu. Wynik ten jest zaskakujący, ze względu na wysoką

migracyjność tego gatunku. Autorzy sugerują, że lokalne warunki środowiskowe sprzyjają intensywnemu rozwojowi populacji co prowadzi do utrwalenia efektu założyciela.

Ngamprasertwong i in. (2008) przeprowadzili analizę na podstawie sieci haplotypów mitochondrialnych markerów molekularnych u nocka rudego. Autorzy ci wykazali silnie ograniczony przepływ genów związany z barierą geograficzną, którą stanowiły pasma górskie na obszarze Szkocji. Stwierdzono również występowanie dwóch kładów, co tłumaczone było efektem rekolonizacji badanego obszaru z dwóch różnych refugium polodowcowych. Bariere geograficzną w postaci Alp zaobserwowano także dla nocków dużych (*Myotis myotis*) (Castella i in., 2001; patrz także Bogdanowicz i in., 2009). Alpy stanowiły barierę geograficzną w procesie kolonizacji Europy z refugium apenińskiego, podczas gdy centralną Europę kolonizowały nocki duże z kilku innych refugium (Bogdanowicz i in., 2009). Z kolei Kerth i Petit (2005) sugerowali wpływ fragmentacji terenów leśnych na strukturę genetyczną nocka Bechsteina (*Myotis bechsteinii*) na terenie Niemiec, Szwajcarii i Bułgarii. Wyniki otrzymane przez tych autorów były zgodne z modelem izolacji przez dystans w przypadku markerów autosomalnych. Jednak dla sekwencji mitochondrialnego DNA te same analizy tylko w jednym z trzech analizowanych regionów dały podobny jak wyżej wynik. Wyjaśnienie uzyskanego zróżnicowania genetycznego w tym przypadku skupia się na fragmentacji środowiska. Mniejsze znaczenie wydaje się mieć dystans geograficzny. Wpływ bariery geograficznej na strukturę genetyczną można zaobserwować również w przypadku archipelagów. Weyeneth (2008), na podstawie sekwencji cytochromu b, analizował strukturę genetyczną nietoperzy z rodzaju *Miniopterus* na wyspach archipelagu Komorów. Autor ten wykazał silną strukturę genetyczną ($\Phi_{ST} = 0,251$) pomiędzy dwoma wyspami. Stwierdzone haplotypy były unikatowe dla obu miejsc, pomimo dość małej odległości (80 km) pomiędzy wyspami.

Bardzo ciekawym zagadnieniem jest zjawisko rozbieżności zachowań tego samego gatunku w różnych środowiskach przyrodniczych. Odmienne uwarunkowania środowiskowe w różny sposób mogą wpływać na behavior osobników, a w efekcie na kształtowanie struktury genetycznej populacji. U karlika malutkiego i karlika drobnego zaobserwowano bardzo małe zróżnicowanie genetyczne między koloniami na terenie Czech, co autorzy powiązali z bardzo intensywnym przepływem genów (Bryja i in., 2009). Jednak Racey i in. (2007) u tych samych gatunków zaobserwowali znacznie ograniczony przepływ genów pomiędzy koloniami w Wielkiej Brytanii. Słabo

zaznaczona struktura genetyczna w kontynentalnej Europie tłumaczona jest sezonowymi przelotami na długich dystansach do miejsc hibernacji, w których mają miejsce kopulacje (Parsons i Jones, 2003; Veith i in., 2004). Zimowiska, skupiające kilka tysięcy osobników, znane są w Europie (Nagy i Szanto, 2003). Drugą hipotezą wyjaśniającą brak struktury genetycznej jest migracja młodych samców z kolonii rozrodczych (u wielu gatunków nietoperzy znana jest silna filopatria samic i znacznie większa migracyjność samców). Różnice zachowań karlików w Europie i Wielkiej Brytanii potwierdzają wyniki zarejestrowanych maksymalnych przelotów (Wielka Brytania, 69 km – Avery, 1991, Europa kontynentalna, 1123 km – Benda i in., 2003). Zróżnicowane zachowania się przedstawicieli tego samego gatunku w odmiennych regionach geograficznych znane są również u borowiaczka (*Nyctalus leisleri*) (Shiel i Fairley, 1999; Ruczyński i Bogdanowicz, 2005).

Niezwykle istotny wpływ na poziom zróżnicowania genetycznego ma również system zachowań rozrodczych. Jest on bardzo złożony u tej grupy zwierząt. U nietoperzy występujących w klimacie umiarkowanym głównym czynnikiem determinującym tryb życia są zmieniające się pory roku. Latem nietoperze są aktywne, natomiast zimą zapadają w stan hibernacji. Temperatura ciała ulega wtedy obniżeniu, a metabolizm spowolnieniu. Taki tryb życia jest głównym czynnikiem wpływającym na sposób rozrodu, a także na długość życia. W porównaniu do zwierząt o podobnych rozmiarach nietoperze żyją znacznie dłużej. W Polsce opisano osobnika podkowca małego (*Rhinolophus hipposideros*), którego wiek wynosił 21 lat (Harmata, 1981); światowy rekord to 41 lat u nocka Brandta (*Myotis brandtii* – Podlutsky i in., 2005). Większość gatunków nietoperzy żyjących w Polsce przystępuje do rozrodu w drugim roku życia. Kopulacje mają miejsce zazwyczaj jesienią bądź zimą. Owulacja jednak następuje dopiero wiosną, do tego czasu nasienie przetrzymywane jest w drogach rodnych samic. Zapłodnienie, a następnie ciąża zachodzą wiosną i latem. Samica rodzi najczęściej jedno młode w czerwcu bądź w lipcu. W tym okresie samice skupiają się w koloniach rozrodczych. Grupy, które tworzą, mogą składać się z kilku, nawet do kilkuset osobników. Kolonie letnie składają się głównie z samic tego samego gatunku, ale zdarzają się również kolonie mieszane. W okresie letnim widoczna jest różnica zachowań osobników różnej płci. Samice z młodymi skupione są w koloniach rozrodczych, podczas gdy dorosłe samce w tym okresie najczęściej żyją samotnie lub w grupach kawalerskich. Zimą, kiedy baza pokarmowa jest bardzo uboga, osobniki obu płci migrują do miejsc hibernacji (głównie jaskiń, sztolni i kopalń) zapewniających

stabilną temperaturę (Altringham, 1996). Na cykl życiowy nietoperzy, oprócz sezonowych wędrówek między letnimi koloniami rozrodczymi a miejscami hibernacji, duży wpływ ma również ich aktywność wiosną i jesienią. Gdy młode osobniki uzyskują samodzielność kolonie rozrodcze ulegają rozproszeniu. Późnym latem i jesienią, nietoperze gromadzą się w duże grupy (setki osobników) przy otworach jaskiń. Ich aktywność nocna w tym czasie polega głównie na krążeniu w locie — zachowanie to określane jest jako rojenie. Rola tego zjawiska nie jest zupełnie jasna, prawdopodobnie ma ono związek z zachowaniami godowymi (Fenton, 1969; Rivers i in., 2005; Furmankiewicz i Altringham 2007), przekazywaniem przez dorosłe osobniki młodym informacji o rozmieszczeniu kryjówek zimowych, bądź wykorzystaniem jaskiń jako schronień tymczasowych (Fenton, 1969). Tak skomplikowany i zróżnicowany pod względem płci system zachowań rozrodczych, wiąże się z różnym stopniem zróżnicowania genetycznego u samic i samców tego samego gatunku. Kerth i in. (2000), analizując strukturę genetycznąnocków Bechsteina (badania na próbie 268 samic z 10 kolonii letnich oraz 20 samcach zasiedlających ptasie budki), stwierdzili bardzo silną filopatrię samic. Autorzy oszacowali tempo migracji pomiędzy koloniami na zaledwie jedną samicę na pięć pokoleń. Haplotypy stwierdzone dla samców oraz ich rozmieszczenie, wskazywały na przemieszczanie się tych osobników w obrębie całego obszaru objętego badaniami. Z kolei w pracach z wykorzystaniem zarówno markerów mitochondrialnego DNA jak i mikrosatelitarnych potwierdzono silną filopatrię samic tego gatunku oraz dużą migracyjność samców (Kerth i in., 2002). Podobne wyniki uzyskano w przypadkunocków dużych (*Myotis myotis*), dla których zróżnicowanie genetyczne dla markerów mitochondrialnych było wysokie i wynosiło $\Phi_{ST} = 0,54$, zaś w przypadku markerów mikrosatelitarnych struktura genetyczna była bardzo słabo zarysowana, a uzyskany wynik $F_{ST} = 0,022$ świadczył o intensywnym przepływie genów pomiędzy badanymi regionami (Castella i in., 2001).

Gacki brunatne, *Plecotus auritus* (Linnaeus, 1758), to nietoperze średniej wielkości, a cechą charakterystyczną tego rodzaju są bardzo duże uszy sięgające $\frac{3}{4}$ długości ciała. Są to jedne z bardziej pospolitych gatunków nietoperzy w naszym kraju. Występują w całej Polsce, zazwyczaj w lasach bądź w ich pobliżu, tworząc kolonie na strychach budynków lub w skrzynkach dla nietoperzy. Unikają terenów zabudowanych, zwłaszcza dużych miast, mogą jednak zasiedlać obrzeża aglomeracji bądź parki. Lot gacków charakteryzuje się bardzo dużą zwrotnością i zawisaniem w powietrzu; jest to przystosowanie do żerowania w ograniczonej przestrzeni np. wśród krzewów.

Morfologia skrzydeł decyduje tym, że gatunek nie wykonuje lotów na długich dystansach. Maksymalny dystans zarejestrowany w Niemczech pomiędzy letnią a zimową kryjówką wynosił 71 km (dla samca) i 29 km (dla samicy). Większość przelotów odbywa się jednak na odległości krótsze niż 30 km (Steffens i in., 2005). Gacki brunatne są nietoperzami osiadłymi i przez cały rok występują w tej samej okolicy. Kolonie rozrodcze formowane są w kwietniu, a większość z nich wykorzystuje te same kryjówki letnie z roku na rok (np. Entwistle i in., 2000). Na jesieni kolonie rozrodcze rozpraszają się. Gacki mogą zimować w sztolniach, jaskiniach, studniach, jednak najbardziej preferują przydomowe piwnice. Miejsca hibernacji muszą zapewniać stabilną temperaturę w przedziale 4–7⁰C. Gatunek ten jest odporny na niską temperaturę, wytrzymuje krótkotrwale spadki do -8⁰C (Sachanowicz i Ciechanowski, 2005).

Istnieje kilka metod pozwalających na zbadania przepływu genów pomiędzy populacjami czy koloniami nietoperzy. Metody pośrednie, takie jak obrączkowanie, posiadają jednak wiele ograniczeń. Praktycznie nie ma możliwości odłowienia wszystkich zwierząt z danej kolonii rozrodczej. Wiele osobników pozostaje ukrytych w szczelinach, często są one niewidoczne i niedostępne dla badaczy. Nie ma również możliwości obserwacji wszystkich zachowań rozrodczych, które mają miejsce jesienią i zimą (gdy kolonie rozrodcze są rozproszone). Badania molekularne z wykorzystaniem różnych markerów genetycznych pozwalają na bezpośredni wgląd w przepływ genów pomiędzy populacjami czy koloniami. Dotychczas prowadzone badania molekularne dotyczące struktury genetycznej gacków brunatnych skupiały się na analizie tego zagadnienia w skali lokalnej. Burland i in. (1999), badając 20 kolonii w północno-wschodniej Szkocji, wykazali, na podstawie sekwencji mikrosatelitarnych, znaczny przepływ genów między koloniami. Uzyskany wynik autorzy powiązali głównie z dyspersją samców. Intensywność przelotów pomiędzy koloniami była wprost proporcjonalna do odległości geograficznej, co potwierdza małą mobilność tego gatunku wynikającą z morfologii skrzydeł i typu lotu. Następne dwie prace, również oparte na markerach mikrosatelitarnych, potwierdziły znaczny przepływ genów między lokalnymi populacjami w południowych Niemczech oraz w polskich Sudetach (Veith i in., 2004; Furmankiewicz i Altringham, 2007). W badaniach przeprowadzonych w Polsce uzyskano niski ogólny indeks $F_{ST} = 0,013$. Jego wartość obliczona dla samców ($F_{ST} = 0,008$) była jednak dwukrotnie niższa niż wartość uzyskana dla samic ($F_{ST} =$

0,016). Różnice w wielkości współczynnika stwierdzono też w przypadku kolonii letnich, gdzie obliczenia przeprowadzono tylko dla samic w porównaniu do kolonii, gdzie indeks liczony był dla obu płci (odpowiednio $F_{ST} = 0,031$ i $F_{ST} = 0,024$). Uzyskane wartości są niskie, a odmienne wyniki zróżnicowania wskazują na większą mobilność samców niż samic pomiędzy koloniami (Furmankiewicz i Altringham, 2007).

Wyniki badań genetycznych przeprowadzonych do tej pory nie są w pełni zgodne z danymi ekologicznymi. Gacki brunatne, jak wynika z obserwacji, są nietoperzami osiadłymi, jednak wyniki uzyskane na podstawie markerów mikrosatelitarnych sugerują intensywny przepływ genów pomiędzy lokalnymi populacjami (Burland i in., 1999; Veith i in., 2004; Furmankiewicz i Altringham, 2007). Słabo zaznaczone struktury genetyczne świadczą o dużej intensywności przelotów osobników w obrębie badanych lokalizacji. Uzyskane wyniki wskazują też na większą filopatrię samic tego gatunku. W poniższej pracy do analizy wykorzystano marker mitochondrialny (dziedziczony w linii żeńskiej). Szybkie tempo mutacji (2% na milion lat – Brown i in., 1979) oraz klonalny charakter dziedziczenia (Birky, 2001) umożliwiają śledzenie kierunków różnicowania się populacji, zjawisk demograficznych czy wzorców migracyjności. W przypadku spodziewanej silnej filopatрии samic oczekuje się uzyskania bardzo wyraźnej struktury genetycznej. Planowane analizy pozwolą też na oszacowanie tempa migracji w większej skali geograficznej, ponieważ żadne z wcześniejszych badań nie obejmowało tak dużego obszaru jak Polska.

Oprócz czynników morfologicznych, behawioralnych czy ekologicznych na strukturę genetyczną populacji i kierunki przepływu genów mają również wpływ czynniki historyczne. Polska, ze względu na położenie geograficzne, wydaje się być bardzo prawdopodobnym obszarem współwystępowania osobników zasiedlających tę część Europy z różnych refugium lodowcowych (np. Bogdanowicz i in. 2009). Wcześniejsze badania gacków brunatnych oparte na markerach mitochondrialnych wskazują na występowanie czterech kładów w Europie i części Azji (Spitzenberger i in., 2006). Dwa klady ograniczone są do obszaru Kaukazu i Hiszpanii. Natomiast pozostałe dwa klady współwystępują w Austrii i Włoszech, dodatkowo jeden z nich swoim zasięgiem obejmuje Grecję i Rosję. Istnienie zachodniej i wschodniej grupy gacków brunatnych w Europie stwierdzili Juste i in. (2004). Również Kiefer i in. (2002) w swoich badaniach wyodrębnił dwie linie ewolucyjne w Europie: pierwszą występującą na terenie Niemiec i Szwajcarii, zaś drugą szeroko rozprzestrzenioną na

obszarze całego kontynentu. Kolonizacja Europy z różnych refugium polodowcowych stwierdzona została dla wielu grup zwierząt. Przeprowadzone do tej pory badania gacków brunatnych nie dają jednak pełnej odpowiedzi na szereg pytań: (i) z ilu refugium miała miejsce kolonizacja? (ii) jaki jest zasięg poszczególnych linii ewolucyjnych w Europie? (iii) kiedy miała miejsce rekolonizacja północnej części Europy? Nie ma żadnych danych dotyczących kolonizacji postglacjalnej obszaru Polski przez gacki. Ze względu na położenie Polski, uzyskane wyniki mogą mieć kluczowe znaczenie w aspekcie poznania i zrozumienia procesów specjacji i kolonizacji.

Nietoperze pełnią ważne funkcje biologiczne, w naszej szerokości geograficznej są przede wszystkim drapieżnikami wielu owadów niszczących uprawy rolne, mogą również przenosić niebezpieczne dla ludzi wirusy. Badania populacji nietoperzy pozwalają na identyfikację czynników wpływających na zmiany ich liczebności czy zmiany zasięgu występowania. Czynniki takimi mogą być postępująca degradacja i fragmentacja środowiska lub zanieczyszczenia pestycydami. Lepsze zrozumienie ekologii i behawioru nietoperzy pozwoli na bardziej efektywną ochronę na poziomie populacyjnym i gatunkowym. Identyfikacja stopnia zróżnicowania genetycznego wewnątrz- i międzypopulacyjnego może mieć istotne konsekwencje w przypadku działań ochronnych podejmowanych na poziomie poszczególnych populacji, jak i całego gatunku. W przypadku uzyskania wyniku potwierdzającego wysoką różnorodność genetyczną, zaistnieje potrzeba ochrony i utrzymania różnorodności biologicznej na obecnym poziomie. Może mieć to konsekwencje w planowaniu czynnej ochrony gatunku i wybranych środowisk. W niektórych przypadkach geograficznie izolowane populacje mogą wymagać szczególnej, indywidualnej ochrony. Zbadanie polskiej populacji gacków brunatnych pod względem kierunków kolonizacji postglacjalnej pozwoli na oszacowanie liczby potencjalnych refugium, z których mogła mieć miejsce kolonizacja, co również będzie podstawą do planowanej strategii ochrony gatunku. Zachowanie odrębnych jednostek ważnych ewolucyjnie jest bardzo istotne ze względu na wkład zmienności genetycznej całego gatunku. Rozpoznanie linii genealogicznych może być przyczynkiem nie tylko do ochrony gatunku w kraju, ale również w Europie.

CEL PRACY

Celem pracy było:

- Poznanie struktury genetycznej krajowej populacji gacka brunatnego, oraz czynników jakie mogły mieć wpływ na jej ukształtowanie
- Oszacowanie liczby migrantów pomiędzy populacjami z różnych regionów geograficznych Polski
- Poznanie procesów demograficznych, które miały wpływ na obserwowaną strukturę genetyczną
- Analiza zależności filogenetycznych pomiędzy stwierdzonymi haplotypami gacków brunatnych
- Zbadanie zależności filogenetycznych pomiędzy stwierdzonymi haplotypami gacków brunatnych w Polsce i haplotypami stwierdzonymi przez innych autorów na terenie Europy

MATERIAŁ I METODY

Użyte skróty

W poniższej pracy użyto następujących skrótów: AMOVA – analiza wariancji molekularnej; ESU – jednostki ważne ewolucyjnie (*evolutionary significant units*); HVI – pierwsza domena superzmienna regionu kontrolnego mtDNA; HVII – druga domena superzmienna regionu kontrolnego mtDNA; ME – minimalnej ewolucji; ML – największej wiarygodności; MP – największej parsymonii; mtDNA – mitochondrialny DNA; MU – jednostki zarządzania (*managment units*); N-J – przyłączenia sąsiada; PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy; pz – par zasad.

Zbiór materiału biologicznego

Zbiór prób prowadzony był w latach 2006–2008, poza okresem hibernacji i porodów nietoperzy. Zwierzęta chwytały się przy pomocy sieci chiropterologicznych, (pozwolenie nr DLOPiK–op/ogiz-4200/IV.D-19/7168/06/aj). Materiał biologiczny pochodził od osobników odławianych w koloniach rozrodczych, na żerowiskach oraz w miejscach rojenia nietoperzy (Tabela 1). Cztery kolonie rozrodcze znajdowały się w budkach nietoperzowych, natomiast pozostałe zajmowały strychy kościołów i domów mieszkalnych. Miejsca rojenia znajdowały się głównie w południowej części kraju i były to strefy przyotworowe jaskiń; z kolei nietoperze w porze żerowania odławiane były w kompleksach leśnych. Od odłowionych zwierząt przy pomocy igły biopsyjnej o średnicy 3 mm pobierany był wycinek błony lotnej. Następnie nietoperze wypuszczano w miejscu odłowów. Zastosowana technika pobierania materiału do badań genetycznych jest mało inwazyjna, ze względu na duże możliwości regeneracyjne błony lotnej, która w miejscu wykonania biopsji zrasta się w okresie od dwóch do czterech tygodni (Worthington-Wilmer i Barratt, 1996; Weaver i in., 2009). Do badań molekularnych wykorzystano próbki pobrane od 398 osobników. Pobrane fragmenty tkanek umieszczano w probówkach zawierających 90% etanol i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu dalszych analiz.

Opis stanowisk

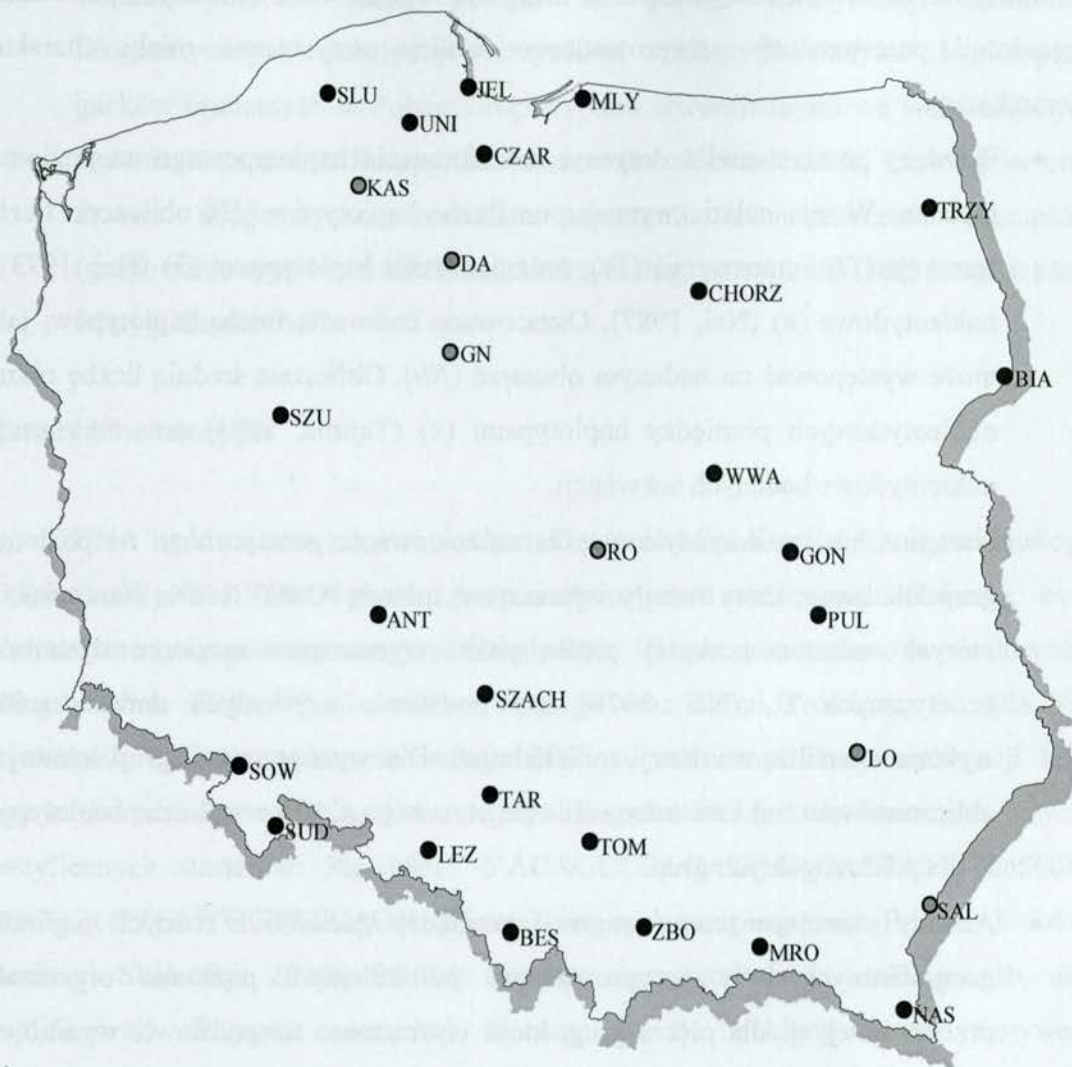
Próby zebrano z 29 stanowisk (Tabela 1, Rycina 1), przy czym w jednym z nich oznaczonym symbolem WWA, próby pochodziły z 14 miejsc oddalonych od siebie w odległości od 0,5 do 10 km. Na podstawie danych pochodzących z badań ekologicznych dotyczących średnich dystansów przelotów tego gatunku (Steffens i in., 2005), próby te zakwalifikowano do jednego stanowiska. Zazwyczaj z jednego miejsca (kolonia letnia, miejsca rojenia) odławiano kilkanaście osobników, jednak wydajność odłowów w porze żerowania jest niższa, co może skutkować zbyt małą próbą dla części analiz. W przypadku sześciu stanowisk, w sumie odłowiono 11 osobników (od 1 do 4 osobników na stanowisko). Próby te zostały wykluczone z analizy struktury genetycznej metodą AMOVA, gdzie wymagana minimalna liczba prób z jednej lokalizacji równa jest pięć. Odłowy miały miejsce zarówno w koloniach, jak i podczas rojenia bądź żerowania zwierząt. Część prób pochodzących z danej lokalizacji składała się zarówno z osobników odłowionych w koloniach jak i w czasie rojenia bądź żerowania. Na południu Polski próby pozyskiwano tylko z miejsc rojenia ponieważ nie są znane miejsca kolonii rozrodczych z wyjątkiem rejonu Sudetów (Furmankiewicz i Altringham, 2007). W północnej i centralnej części kraju próby pozyskiwano zarówno z żerowisk jak i z kolonii letnich (Tabela 1, Rycina 1).

Symbol	Region	Typ stanowiska	Liczba prób	Wykluczone	Łączna liczba prób
WA	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	14	0	14
WA1	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA2	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA3	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA4	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA5	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA6	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA7	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA8	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA9	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA10	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA11	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA12	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA13	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA14	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA15	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA16	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA17	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA18	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA19	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA20	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA21	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA22	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA23	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA24	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA25	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA26	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA27	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA28	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA29	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA30	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA31	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA32	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA33	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA34	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA35	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA36	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA37	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA38	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA39	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA40	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA41	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA42	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA43	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA44	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA45	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA46	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA47	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA48	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA49	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA50	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA51	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA52	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA53	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA54	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA55	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA56	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA57	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA58	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA59	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA60	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA61	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA62	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA63	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA64	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA65	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA66	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA67	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA68	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA69	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA70	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA71	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA72	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA73	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA74	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA75	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA76	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA77	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA78	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA79	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA80	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA81	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA82	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA83	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA84	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA85	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA86	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA87	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA88	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA89	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA90	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA91	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA92	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA93	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA94	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA95	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA96	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA97	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA98	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA99	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1
WA100	Województwo Lubuskie	Kolonia letnia	1	0	1

Rycina 1. Rozmieszczenie zebranych prób czarno punktów reprezentujący stanowiska w sądownictwie krajowym w województwie lubuskim. Wyłączenia zostały w tym celu w tabeli 1.

Tabela 1. Liczba osobników z poszczególnych stanowisk z przypisaniem do regionów Polski. W obrębie każdego stanowiska podana jest liczba osobników odłowiona z kolonii – K, miejsc rojenia – R, żerowiska – Ż, suma wszystkich osobników – *n*.

Stanowisko	Symbol Stanowiska	K	R	Ż	<i>n</i>	Region
Jelitkowo	JEL	6	-	-	6	Pobrzeże Bałtyku
Młynary	MLY	-	-	8	8	Pobrzeże Bałtyku
Czarlin	CZAR	-	-	8	8	Pojezierze Pomorskie
Uniradze	UNI	16	-	-	16	Pojezierze Pomorskie
Słupsk	SLU	7	-	-	7	Pojezierze Pomorskie
Kasprzyk	KAS	3	-	1	4	Pojezierze Pomorskie
Dębina	DA	-	-	1	1	Pojezierze Pomorskie
Chorzele	CHORZ	7	-	1	8	Pojezierze Mazurskie
Trzrzeczki	TRZY	16	-	2	18	Nizina Północnopodlaska
Białowieża	BIA	-	-	10	10	Nizina Północnopodlaska
Warszawa	WWA	9	-	19	28	Nizina Mazowiecka
Gończyce	GON	15	-	-	15	Nizina Mazowiecka
Rogów	RO	-	-	1	1	Nizina Mazowiecka
Antonin	ANT	30	-	3	33	Nizina Wielkopolsko - Kujawska
Szubert	SZU	-	-	6	6	Nizina Wielkopolsko - Kujawska
Gniewkowo	GN	-	-	2	2	Nizina Wielkopolsko - Kujawska
Szachownica	SZACH	-	-	8	8	Wyżyna Krakowsko - Wieluńska
Tomaszówki	TOM	-	6	-	6	Wyżyna Krakowsko - Wieluńska
Puławy	PUL	-	-	5	5	Wyżyna Lubelska
Lązek	LO	-	-	1	1	Wyżyna Lubelska
Lęszczok	LEZ	-	-	12	12	Górny Śląsk
Tarnowskie	TAR	-	21	-	21	Górny Śląsk
Sowie	SOW	46	-	-	46	Sudety Zachodnie
Sudety	SUD	18	16	-	34	Sudety Wschodnie
Beskidy	BES	-	42	4	46	Beskid Zachodni
Zbójnicka	ZBO	-	23	-	23	Beskid Zachodni
Mroczna	MRO	-	12	-	12	Beskid Wschodni
Nasieczne	NAS	-	11	-	11	Bieszczady Zachodnie
Salis-soglio	SAL	-	-	2	2	Kotlina Sandomierska
Σ		173	131	94	398	



Rycina 1. Rozmieszczenie zebranych prób; czarne punkty reprezentują stanowiska, w których odłowiono co najmniej pięć osobników. Wyjaśnienia skrótów znajdują się w Tabeli 1.

Ponieważ zróżnicowanie genetyczne może być wykazywane na różnych poziomach organizacji przestrzennej, przeprowadzone analizy statystyczne miały charakter hierarchiczny.

- Pierwszy poziom analiz dotyczył zróżnicowania haplotypowego na poziomie gatunku. W tej analizie wyznaczono liczbę haplotypów (H), obliczono liczbę tranzykcji (T_i) i transwersji (T_v), zróżnicowania haplotypowe (h) (Nei, 1973) i nukleotydomowe (π) (Nei, 1987). Oszacowano całkowitą liczbę haplotypów, jaka może występować na badanym obszarze (Nh). Obliczoną średnią liczbę różnic nukleotydomowych pomiędzy haplotypami (k) (Tajima, 1983) oraz frekwencje nukleotydomowe badanych sekwencji.
- Następną analizę dotyczyła stopnia zróżnicowania genetycznego na poziomie grup lokalnych, które zostały wyznaczone metodą AMOVA. Dla stanowisk, w których zebrano powyżej pięciu próbek, wyznaczono macierze dystansów genetycznych D_A (Nei, 1979). Na podstawie uzyskanych dendrogramów wykonano analizę wariancji molekularnej. Dla wyznaczonych grup lokalnych obliczono wskaźniki zróżnicowania genetycznego h , π , k oraz liczbę haplotypów H dla poszczególnych grup.
- Analizy szacujące tempo migracji pomiędzy gackami z różnych regionów geograficznych były przeprowadzone na kolejnym poziomie organizacji przestrzennej, tj. dla pięciu grup, które wyznaczono na podstawie wyników z analizy struktury genetycznej populacji.
- Kolejny poziom analizy został przeprowadzony z uwzględnieniem podziału stanowisk z uwagi na pełnioną funkcję. Lokalizacje podzielono na trzy grupy (kolonie letnie, miejsca rojenia, żerowiska), obliczono współczynniki zróżnicowania genetycznego h , π , k oraz liczbę haplotypów H . Oszacowano całkowitą liczbę haplotypów, jaka może występować na badanym obszarze, przy uwzględnieniu kolejnych grup lokalizacji. W celu weryfikacji modelu izolacji przez dystans w obrębie trzech grup lokalizacji przeprowadzono testy Mantela
- Z uwzględnieniem wszystkich zidentyfikowanych haplotypów, przeprowadzono analizę filogenetyczną oraz demograficzną. Skonstruowano drzewa filogenetyczne oraz sieci zależności haplotypów. Wykonano cztery testy neutralności, oraz analizę rozkładu liczby różnic nukleotydomowych między parami haplotypów.

- Ostatni poziom analiz polegał na próbie identyfikacji zależności filogenetycznych pomiędzy wszystkimi zidentyfikowanymi haplotypami gacków brunatnych w Polsce i haplotypami stwierdzonymi we wcześniejszych badaniach na terenie Europy. Skonstruowano sieci zależności haplotypów oraz drzewa filogenetyczne metodami opartymi na macierzach dystansów (grupowanie typu N-J i UPGMA), maksymalnej parsymonii (MP) i największej wiarygodności (ML).

Metody laboratoryjne

DNA izolowano za pomocą zestawu Genomic Mini firmy A&A Biotechnology (Gdynia). Wycinki błon lotnych, bezpośrednio przed całkowitą inkubacją, były rozdrabniane przy pomocy sterylnych skalpelów. Tkanki inkubowano w środowisku 100 µl buforu TRIS, 50 µl buforu lizującego oraz 20 µl Proteinazy K. Dla 398 uzyskanych izolatów wykonano reakcję PCR, w celu amplifikacji sekwencji HVI regionu kontrolnego mtDNA. Sekwencje o długości 343 pz uzyskano przy użyciu specyficznych starterów: Ple 166L: 5'ACAGCCCACATGAACATTA3'; Ple560H: 5'GCGGGTTGMTGGTTTCAC3' zaprojektowanych w programie Primer 3 0.4.0. (Rozen i Skaletsky, 2000). Startery zostały zaprojektowane w taki sposób, aby amplifikowały fragment pierwszej domeny za 81 nukleotydowym motywem powtarzającego się od 3–7 razy w rejonie kontrolnym u wielu gatunków nietoperzy (Wilkinson i Chapman, 1991; Wilkinson i in., 1997). Warunki reakcji PCR były następujące: wstępna denaturacja 94°C – 3 min., denaturacja 94°C – 30 s., przyłączanie starterów 55°C – 30 s., kopiowanie sekwencji 72°C – 1 min., końcowe kopiowanie sekwencji 72°C – 5 min. Cykl (z wyjątkiem wstępnej denaturacji oraz końcowego kopiowania sekwencji) powtarzany był 40 razy. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 25 µl Ready mix firmy Sigma (Sigma-Aldrich, Poznań), 1 µl każdego ze starterów (10 µM), 3 µl DNA matrycowego, 20 µl wody. Dla każdego 32 prób w reakcji PCR wykonana była negatywna kontrola (próbka nie zawierająca matrycowego DNA). Produkty amplifikacji wizualizowano na 1,5% żelu agarozowym, a następnie oczyszczano za pomocą zestawu Clean Up firmy A&A Biotechnology. Reakcje sekwencjonowania prowadzone były przy użyciu zestawu GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit firmy Beckman Coulter (Comesa, Warszawa).

Sekwencje o długości 343 pz uzyskano zarówno dla nici lekkiej i ciężkiej DNA przy użyciu automatycznego sekwenatora kapilarnego CEQ 8000 (Beckman Coulter). Wyniki sekwencjonowania analizowane były za pomocą programu Genetic Analysis System CEQ 8000. Wszystkie procedury laboratoryjne przeprowadzono w Pracowni Techniki Molekularnych i Biometrycznych Muzeum i Instytutu Zoologii PAN w Warszawie.

Analiza zróżnicowania regionu kontrolnego (HVI) mitochondrialnego DNA

Uzyskane sekwencje zostały uliniowane w programie BioEdit 7.0.9. (Hall 1999). Liczbę haplotypów wyznaczono przy użyciu programu Arlequin 3.11 (Excoffier i in., 2005). Programu tego użyto również do obliczenia ilości tranzycji – T_i (zamiana puryn: A i G lub pirymidyn: C i T), transwersji – T_v (zamiana puryny na pirymidynę lub odwrotnie) oraz delecji/insercji (utrata/wbudowanie części sekwencji) pomiędzy zidentyfikowanymi haplotypami. Obliczono też wskaźniki zróżnicowania genetycznego h i π dla całej badanej populacji gacków brunatnych. Oszacowano także całkowitą liczbę haplotypów, jaka może występować na badanym obszarze. W tym celu wykorzystano metodę Kohna i in. (1999), która pozwala na kompensację różnic wynikających z wielkości próby i różnic wynikających ze zbioru różnej liczby osobników z poszczególnych lokalizacji. Wielkość populacji mierzona była jako asymptota (a) funkcji: $y = (ax) / (b+x)$, gdzie y jest całkowitą liczbą haplotypów, x liczbą analizowanych prób (osobników), a współczynnik b określa tempo opadania krzywej (stopień odchylenia krzywej). Obliczenia te wykonano w programach Gimlet 1.3.3. (Valiere, 2002) i R. 2.3.0. (R Development Core Team, 2008). Zostało przeprowadzonych 1000 permutacji – obliczony wynik dla obu parametrów (a i b) stanowi średnią.

Analiza genetycznej struktury populacji gacków brunatnych w Polsce

W poniższej analizie wykorzystano sekwencje uzyskane dla osobników pochodzących z 23 stanowisk, w których odłowiono co najmniej pięć osobników (Rycina 1). Przedstawiciele tego gatunku wykazują ciągły zasięg na badanym obszarze, jednak prawdopodobieństwo, że dwa osobniki będą bardziej różniły pod względem genetycznym powinno rosnać wraz z odległością geograficzną. Aby zbadać hipotezę

izolacji przez dystans, przeprowadzono test Mantela przy użyciu programu Arlequin (Excoffier i in., 2005). Polega on na korelacji macierzy dystansu genetycznego i macierzy dystansu geograficznego. Macierz dystansu genetycznego stanowiły wartości D_A (Nei, 1979) dla poszczególnych par stanowisk. Aby oszacować te wartości, dla uzyskanych sekwencji, w programie MrModeltest 2.1 (Nylander, 2004), określono model substytucji HKY + G (Hasegawa i in., 1985). Ponieważ nie ma możliwości zastosowania tego modelu w programie Arlequin (Excoffier i in., 2005), analizę przeprowadzono z uwzględnieniem modelu substytucji Tamura - Nei (TrN) (Tamura i Nei, 1993) z parametrem $\gamma = 0,28$. Dla modelu TrN, który jest specjalnym przypadkiem modelu HKY + G, wartość parametru γ została oszacowana w programie Tree Puzzle 5.2. (Schmidt i in., 2002). Macierz dystansu geograficznego (wyrażonego w kilometrach) pomiędzy parami lokalizacji, obliczono przy pomocy programu Geographic Distance Matrix Generator 1.2.3. (Ersts, http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg). W tym przypadku dla oszacowania istotności statystycznej testu wykonano 10 000 permutacji.

W celu analizy dystrybucji zmienności genetycznej badanej populacji wykonano molekularną analizę wariancji AMOVA w programie Arlequin (Excoffier i in., 2005). W programie MEGA 4.0.2. (Kumar i in. 2008) wyznaczono dendrogramy metodami UPGMA, N-J i ME na podstawie macierzy dystansów genetycznych D_A . Wraz z uwzględnionym dystansem geograficznym stanowiły one podstawę do połączenia prób z poszczególnych stanowisk w większe jednostki. Metoda AMOVA hierarchicznie analizuje wariancję genetyczną na trzech poziomach: Φ_{CT} – poziom zmienności między regionami geograficznymi (między grupami stanowisk), Φ_{SC} – poziom zmienności między stanowiskami w obrębie grup stanowisk, Φ_{ST} – poziom zmienności w obrębie stanowisk. Przy użyciu AMOVY testowane były różne podziały geograficzne. Dystans geograficzny stanowisk oraz otrzymane dendrogramy stanowiły podstawę testowania wielkości parametrów analizy AMOVA pomiędzy grupami lokalizacji. Istotność analizy testowana była dla 10 000 permutacji. Istotnie statystyczny podział maksymalizujący wariancję genetyczną pomiędzy grupami stanowisk (parametr Φ_{CT}) stanowił wynik analizy AMOVA. Wyznaczone grupy lokalizacji (dalej zwane grupami lokalnymi) oznaczono symbolem G z odpowiednim numerem.

Obliczono również indeks utrwalenia F_{ST} , który jest miarą zróżnicowania genetycznego w populacji. W powyższym przykładzie odnosi się on do poszczególnych

lokalizacji i określa prawdopodobieństwo, że dwa losowo wybrane haplotypy z danej lokalizacji mają wspólne pochodzenie. Analizę wykonano w programie Arlequin (Excoffier i in., 2005).

Dla wyznaczonych grup lokalnych określono liczbę osobników, haplotypów oraz obliczono wskaźniki zróżnicowania genetycznego (h , π , k). W celu sprawdzenia zależności filogenetycznych między grupami lokalnymi, skonstruowano dendrogramy dystansów genetycznych D_A , metodami N-J, UPGMA oraz ME przy użyciu programu MEGA 4.0.2. (Kumar i in. 2008).

Dodatkowo przeprowadzono analizę z wykorzystaniem algorytmu Monmoniera (1973) w programie Barrier 2.2. (Manni i in., 2004). Algorytm ten identyfikuje bariery w przepływie genów poprzez maksymalizację różnic między parami populacji. Pierwszym etapem analizy jest triangulacja Delaunay, polegająca na łączeniu punktów (lokalizacji) za pomocą sieci trójkątów. Następnie wyznaczane są wieloboki Voronoi (1908). Na podstawie uzyskanych wieloboków określone są bariery genetyczne w oparciu o macierz dystansu genetycznego D_A . Pierwsza bariera jest prowadzona prostopadle w stosunku do sieci, rozpoczynając od krawędzi o największym dystansie, kończąc na ostatniej krawędzi w sieci, bądź na krawędzi tworzącej pętlę. W przypadku generowania wielu barier, kolejne tworzone są hierarchicznie, przy czym procedura może być powtarzana do etapu osiągnięcia wcześniej obliczonej bariery. Dla przedstawienia rang poszczególnych barier, ich grubość jest wprost proporcjonalna do odwrotności ilorazu największego dystansu genetycznego występującego w macierzy D_A do wartości dystansu obliczonego dla poszczególnych par lokalizacji w obrębie bariery.

Analiza liczby migrantów pomiędzy grupami lokalnymi

W celu zbadania intensywności przepływu genów między poszczególnymi grupami lokalnymi, została przeprowadzona analiza tempa migracji w programie MDIV (Nielsen i Wakeley, 2001). W przypadku tej analizy wymagane jest wyznaczenie kilku grup o znacznych liczebnościach. Podstawą do kojarzenia stanowisk w regiony geograficzne, oprócz wyników analizy AMOVA, były również dendrogramy wyznaczone pomiędzy grupami lokalnymi. Na ich podstawie, połączono grupy lokalne o mniejszych liczebnościach (G4–G7) z obszaru północy kraju w jedną grupę zwaną dalej grupą GP (grupą północną). Program MDIV (Nielsen i Wakeley, 2001) oparty

jest na wnioskowaniu Bayesowskim i pozwala oszacować następujące parametry: θ (mierzona jako $2N_e\mu$, gdzie N_e jest efektywną wielkością populacji dla mtDNA, a μ jest tempem mutacji sekwencji na rok), M średnia liczba samic migrantów (mierzony jako $2N_e m$, gdzie m jest częstością migracji), czas dywergencji populacji T (mierzone jako t/N_e , gdzie t oznacza czas (wyrażony w latach) od momentu dywergencji) oraz $TMRCA$ (*time of most recent common ancestor*) – czas jaki upłynął od wystąpienia najmłodszego wspólnego przodka (mierzony jako $tMRCA/N_e$, gdzie $tMRCA$ jest czasem jaki upłynął od dywergencji sekwencji). Do oszacowania powyższych parametrów dla każdej pary regionów przeprowadzono analizę 3 łańcuchów Markowa o długości 3 000 000. Początkowych 300 000 iteracji nie zostało uwzględnionych (*burn-in*) w analizie przestrzeni stanów. Każda analiza była rozpoczynana z różną wartością początkową generatora liczb pseudolosowych. W przypadku gdy wartość maksymalna szacowanego parametru była zbliżona do wartości maksymalnej zadanej *a priori*, analiza prowadzona była kolejny raz z uwzględnieniem wyższej wartości parametru. Obliczenia prowadzone były z uwzględnieniem modelu HKY '85 oraz parametrami M_{max} (maksymalne tempo migracji) i T_{max} (maksymalny czas dywergencji) = 5; 10; 20. Dla każdej analizy parametry te zostały wybrane na podstawie generowanego rozkładu prawdopodobieństwa o kształcie jednomodalnym. Dla parametrów θ oraz M zostały wyznaczone bayesowskie przedziały ufności 95%; przedziały te nie zostały wyznaczone dla parametru T ponieważ rozkład prawdopodobieństwa tego parametru po osiągnięciu maksimum bardzo wolno zbliża się do wartości zero. Parametr szacujący czas dywergencji między grupami został przekształcony na czas wyrażony w latach przy użyciu formuły $t = T * \theta / 2 * \mu$; także czas dywergencji sekwencji wyrażono w tych jednostkach po przeliczeniu $tMRCA = TMRCA * \theta / 2 * \mu$. Tempo mutacji HVI u nietoperzy szacuje się na około 20% na mln lat — przykładem może być borowiec wielki (*Nyctalus noctula*) (Petit i in., 1999) lub nocek Bechsteina (*Myotis bechsteinii*) (Kerth i in., 2008).

Analiza zróżnicowania genetycznego z uwzględnieniem funkcji ekologicznych stanowisk

Poniższą analizę przeprowadzono z uwzględnieniem podziału siedlisk na trzy typy z uwagi na pełnioną funkcję ekologiczną. Dla osobników odławianych w

koloniach, w miejscach rojenia oraz na żerowiskach obliczono wskaźniki zróżnicowania genetycznego: h i π . Dla wszystkich trzech typów siedlisk obliczono całkowitą liczbę haplotypów metodą Kohna (patrz rozdział Analiza zróżnicowania rejonu kontrolnego (HVI) mitochondrialnego DNA). Z uwzględnieniem powyższego podziału przeprowadzono testy Mantela (metodyka patrz rozdział Analiza genetycznej struktury populacji gacków brunatnych w Polsce).

Analizy filogeograficzna i demograficzna z uwzględnieniem wszystkich haplotypów z Polski

W celu sprawdzenia czy badana populacja znajduje się w stanie równowagi, bądź czy w niedawnej historii populacji nie doszło do ekspansji, przeprowadzono analizę przy wykorzystaniu czterech testów neutralności w programach DNAsp 5.10.00 (Librado i Rozas, 2009) oraz Arlequin (Excoffier i in., 2005). Za pomocą poniższych testów możliwe jest zbadanie procesów demograficznych, jakie mogły mieć miejsce w przeszłości. Pierwszy test D_T (Tajima, 1989) testuje wielkość różnicy pomiędzy średnią liczbą różnic nukleotydowych między parami sekwencji (π) a ilorzem liczby miejsc polimorficznych (S) i sumą odwrotności wielkości próby (n). Statystycznie istotne dodatnie wartości świadczą, że sekwencja podlega selekcji zrównoważonej. Wartości ujemne wskazują, że sekwencja podlega selekcji kierunkowej bądź mogą oznaczać ekspansję przez jaką przeszła populacja wcześniej. Kolejne dwa testy D^* i F^* (Fu i Li, 1993) uwzględniają genealogię haplotypów, czyli kolejność formowania się drzewa haplotypów oraz czas jaki upłynął od pojawienia się haplotypu. W przypadku selekcji negatywnej lub ekspansji geograficznej pojawi się tendencja do nadmiernej liczby mutacji w młodszych częściach drzewa genealogicznego (test przyjmie wartości ujemne), natomiast selekcja stabilizująca może powodować występowanie niedoboru haplotypów na zewnętrznych gałęziach drzewa (test przyjmie wartości dodatnie). Test D^* opiera się na różnicy między liczbą mutacji (typu *singleton* – substytucja nukleotydowa występująca w jednej sekwencji w stosunku do pozostałych) a całkowitą liczbą mutacji nukleotydowych między parami sekwencji. Z kolei w teście F^* różnica ta liczona jest dla średniej liczby różnic nukleotydowych między parami sekwencji. Ostatnim testem jest test F_s (Fu, 1997), który charakteryzuje się największą skutecznością w wykrywaniu nadmiaru nowych mutacji. Ujemne wartości statystyki F_s są charakterystyczne dla ekspansji demograficznej bądź geograficznej.

Dodatkowo przeprowadzono analizę rozkładu liczby różnic nukleotydowych między parami haplotypów (*mismatch distribution*) przy użyciu programów DNAsp 5.10.00 (Librado i Rozas, 2009) oraz Arlequin (Excoffier i in., 2005). Populacje znajdujące się w równowadze demograficznej lub w regresji charakteryzuje wielomodalny rozkład różnic nukleotydowych, nieróżniczkowalny w wielu punktach. Natomiast populacja, która przeszła demograficzną ekspansję powinna wykazywać rozkład jednomodalny. Użyta metoda opiera się na założeniu cyklicznie występujących zjawisk ekspansji populacji od N_0 do N_1 osobników t pokoleń temu, po której następuje równowaga demograficzna. Model analizy oparty jest na trzech parametrach: $\theta_0 = 2N_0\mu$ (Theta początkowe poprzedzające wzrost lub spadek liczebności populacji), $\theta_1 = 2N_1\mu$ (Theta końcowe po wzroście lub spadku liczebności populacji) i $\tau = 2\mu t$ (τ jest czasem, w jakim nastąpił wzrost lub spadek liczebności populacji, μ = tempo mutacji) (Rogers i Harpending, 1992). W celu wygenerowania szacowanego rozkładu z założeniem modelu nagłej ekspansji użyto 1000 permutacji. Suma odchyłeń standardowych (SSD) pomiędzy obserwowanym a oczekiwanym rozkładem wykorzystana była do obliczenia prawdopodobieństwa P wyrażonego jako proporcja różnicy między oczekiwaną a obserwowaną wartością. Statystyką testu jest współczynnik nierównomierności R_g (*reggadness index*), jego istotność liczona była w taki sam sposób jak SSD. Niskie wartości współczynnika nierównomierności są typowe dla populacji w ekspansji, natomiast wyższe wartości są obserwowane w przypadku stabilności lub zjawiska „szyjki butelki” przez jakie przeszła populacja. Dodatkowo przeprowadzono test R_2 (Ramos-Onsins i Rozas, 2002), który testuje wystąpienie spodziewanej liczby mutacji w populacji po wystąpieniu zjawisk ekspansji. Jeśli hipoteza ekspansji nie może być odrzucona na podstawie przeprowadzonych testów, możliwe jest oszacowanie czasu jaki minął od jej wystąpienia. Po przekształceniu $\tau = 2\mu t$, otrzymujemy czas wyrażony w pokoleniach $t = \tau / 2\mu$, $t = (\tau - \text{estymator czasu od ekspansji}) / [(\text{tempo mutacji na milion lat} * \text{długość sekwencji}) / 1 \text{ milion lat}]$ (Voje i in., 2009).

Na podstawie uzyskanych sekwencji rejonu kontrolnego mtDNA skonstruowano drzewa filogenetyczne w programie Phylip 3.68 (Felsenstein, 2005). Drzewa te zostały ukorzenione ośmioma ortologicznymi sekwencjami nietoperzy z gatunku mopek (*Barbastella barbastella*) (Tabela 2). Są one udostępnione w internetowej bazie genów (GenBank) (Benson i in., 2008). Analizy dystansów wykorzystujące metody grupowania typu UPGMA i N-J zostały przeprowadzone na podstawie modelu dwuparametrycznego Kimury - $K2P$ (Kimura, 1980). W programie tym skonstruowano

również drzewa metodami MP i ML. Wiarygodność otrzymanych drzew oceniana była poprzez wyznaczeniem wielkości „bootstrapu” (Felsenstein, 1985) dla 1000 replikacji. Przeprowadzono również bayesowską analizę w programie MRBAYES 3.1. (Huelsenbeck i Ronquist, 2001) z użyciem modelu substytucji HKY + G. Obliczenia przeprowadzone były dla 2 milionów pokoleń (cztery łańcuchy MCMC) w czterech niezależnych analizach; próbkowanie drzew następowało co 100 generacji. Jednak żadna z przeprowadzonych analiz nie osiągnęła wymaganego poziomu odchylenia standardowego poniżej 1%.

W programie DNAsp (Librado i Rozas, 2009) obliczono poziom zróżnicowania genetycznego pomiędzy wyznaczonymi kładami.

Tabela 2. Numery sekwencji (GenBank) nietoperzy dla *B. barbastella* wykorzystanych do ukorzenia kladogramów.

L.p.	Numer sekwencji z banku genów	Źródło
1	BBU95331	Wilkinson i in., 1997
2	AF515164	Juste i in., 2003
3	AF515163	Juste i in., 2003
4	AF515162	Juste i in., 2003
5	AF515161	Juste i in., 2003
6	AF515154	Juste i in., 2003
7	AY254218	Juste i in., 2003
8	AF515159	Juste i in., 2003

W celu analizy zależności między otrzymanymi haplotypami wykonano sieć relacji filogenetycznych między haplotypami w programie Network 4.5.1.0. Copyright Fluxus Technology Ltd. 1999–2009: (www.fluxus-engineering.com). Sieć została skonstruowana metodą MP z wykorzystaniem algorytmu *median-joining* (Bandelt i in., 1999) pozwalającego na użycie danych zawierających wiele stanów cechy. Algorytm ten jest połączeniem algorytmu Kruskala (1956) znajdującego sieci o najmniejszej rozpiętości (*minimum spanning network*) oraz heurystycznego algorytmu największej parsymonii Farrisa (1970), który stopniowo dodaje węzły (wierzchołki – *median vectors*), wektory stanowiące hipotetyczne haplotypy niezbędne do wygenerowania

połączeń zgodnych z zasadą maksymalnej parsymonii. Sieć została skonstruowana dla wartości parametru redukującego liczbę możliwych połączeń w sieci $\varepsilon = 0$, ze względu na znaczną ilość haplotypów. Dodatkowo przy pomocy algorytmu *star contraction* (Forster i in., 2001) w tym samym programie zdefiniowano klastry w całej sieci o topologii gwiazdy i wyznaczono haplotypy centralne.

Analiza filogenetyczna wszystkich znanych haplotypów HVI gacków brunatnych

W celu analizy zależności filogenetycznych pomiędzy haplotypami gacków brunatnych z innych części Europy, wyszukano w bazie GenBank (Benson i in., 2008) oraz uliniowano w programie BioEdit (Hall 1999) haplotypy dla badanego fragmentu uzyskane przez innych autorów (Tabela 3). Ponieważ dołączone do analiz sekwencje różniły się długością, do analiz wykorzystano wspólny fragment rejonu kontrolnego mtDNA, o długości 343 pz. Na podstawie zgromadzonych danych skonstruowano drzewa i sieć metodami opisanymi w poprzednim rozdziale. Ze względu na znaczną ilość wszystkich analizowanych haplotypów wygenerowano jedynie szkielet sieci z uwzględnieniem ilości kroków mutacyjnych pomiędzy haplotypami.

Dodatkowo przeprowadzono analizę filogenetyczną z uwzględnieniem unikatowego okazu gacka brunatnego pochodzącego z Armenii a znajdującego się w zbiorach Muzeum i Instytutu Zoologii PAN. Z powodu znacznej degradacji materiału genetycznego do analizy użyto krótkiego fragmentu DNA (163 pz) końca 3' regionu kontrolnego mtDNA, amplifikację oraz sekwencjonowanie przeprowadzono według metody Kiefera i in. (2002). Otrzymaną sekwencję uliniowano z ortologicznymi sekwencjami gacków brunatnych pochodzących z innych krajów Eurazji (Tabela 4). Skonstruowano zarówno sieć jak i drzewo zależności filogenetycznych (ML) w programach Network (www.fluxus-engineering.com) i Phylip (Felsenstein, 2005). Do ukorzenia otrzymanego drzewa wykorzystano sekwencję gacka szarego (*Plecotus austriacus*) (Tabela 4).

Tabela 3. Numery sekwencji (GenBank) 14 haplotypów gacków brunatnych (*Plecotus auritus*) użytych w analizie wszystkich znanych haplotypów.

L.p.	Numer sekwencji z GenBank	Źródło
1	AF515172	Juste i in., 2004
2	AF515173	Juste i in., 2004
3	AF515166	Juste i in., 2004
4	AF515167	Juste i in., 2004
5	AF515168	Juste i in., 2004
6	AF515178	Juste i in., 2004
7	AF515174	Juste i in., 2004
8	AF515175	Juste i in., 2004
9	AF515176	Juste i in., 2004
10	AF515177	Juste i in., 2004
11	AF515169	Juste i in., 2004
12	AF515170	Juste i in., 2004
13	AF515171	Juste i in., 2004
14	AY030077	Spitzenberger i in., 2001

Tabela 4. Numery sekwencji (GenBank) haplotypów gacków brunatnych i gacka szarego (*P.austriacus*) zaobserwowanych w Eurazji.

Haplotyp	Lokalizacja	Numer sekwencji z GenBanku	Źródło
H1	Polska	–	niniejsza praca
H2	Armenia	–	niniejsza praca
H3	Rosja, m. Czarne	DQ294146	Spitzenberger i in., 2006
H4	Rosja, Moskwa	AY133997	Kiefer i in., (2002)
H5	Rosja, j. Ładoga	AY324402	Spitzenberger i in., 2006
H6	Szwajcaria	AY133993	Kiefer i in., (2002)
H7	Niemcy	AY133996	Kiefer i in., (2002)
H8	Hiszpania	DQ294143	Spitzenberger i in., 2006
H9	Austria	AY030067	Spitzenberger i in., 2006
H10	Włochy	DQ294129	Spitzenberger i in., 2006
<i>P.austriacus</i>	Mołdawia	DQ294202	Spitzenberger i in., 2006

WYNIKI

Różnorodność mitochondrialnego DNA w polskiej populacji gacka brunatnego

Dla 398 zanalizowanych prób stwierdzono 120 haplotypów (Tabela 5, patrz także Załącznik I).

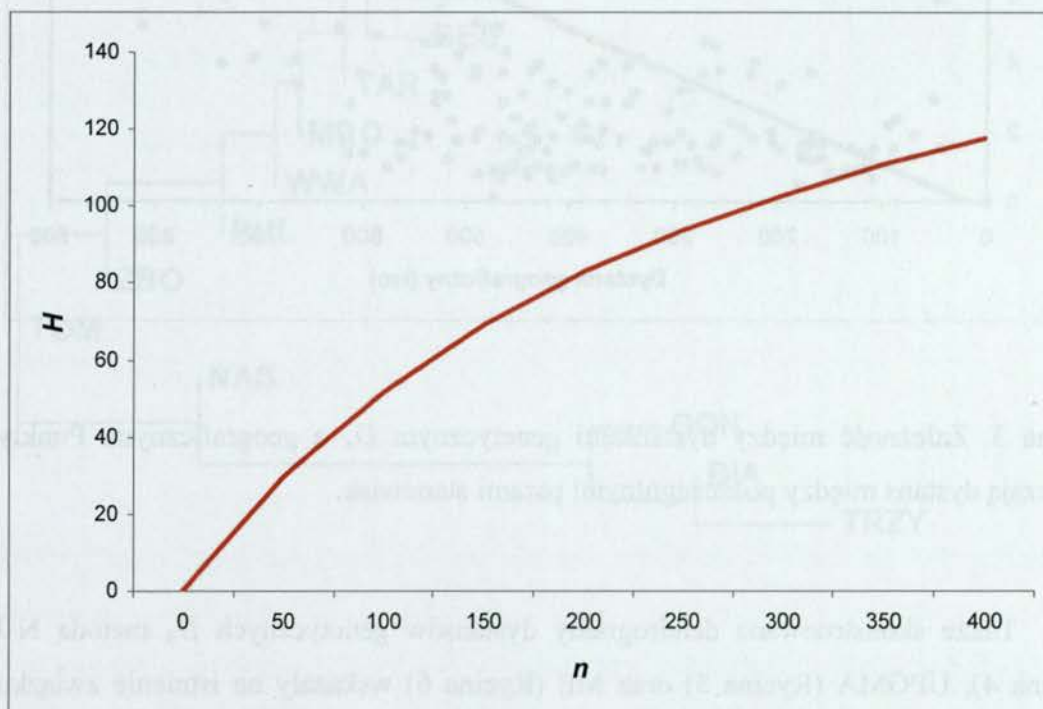
Tabela 5. Występowanie haplotypów mtDNA w poszczególnych lokalizacjach. Haplotypy zaznaczone pogrubieniem wystąpiły w co najmniej 4 lokalizacjach.

Stanowisko	Numery haplotypów
JEL	H6,H54,H55
MLY	H21
CZAR	H22 ,H54,H75,H117,H118
UNI	H55
SLU	H22 ,H64
KAS	H119,H120
DA	H120
CHORZ	H57,H58,H59
TRZY	H22 ,H34,H61
BIA	H62,H86
WWA	H1,H2,H31,H33,H34,H35,H36,H37,H50,H51,H52,H53,H62,H72,H106,H107,H110
GON	H108
RO	H61
ANT	H12,H13,H14,H24,H25
SZU	H8,H116
GN	H16
SZACH	H3,H11,H48,H81,H99,H111,H112,H113
TOM	H8,H32,H81,H82,H83
PUL	H93,H108,H109
LO	H56
LEZ	H21 ,H60
TAR	H21 ,H27,H34,H70,H79,H99,H100,H101,H102,H103,H104,H105
SOW	H3,H4,H5,H6,H7,H8,H9,H10,H11
SUD	H4,H9,H14,H15,H16,H17,H18,H19,H20, H21 , H22 ,H23
BES	H21 , H22 ,H49,H65,H66,H67,H68,H69,H70,H71,H73,H74,H75,H77,H78,H79,H80
ZBO	H22 ,H26,H27,H28,H29,H30,H31,H32,H38,H39,H40,H41,H42,H44,H45,H46,H47,H48
MRO	H22 ,H94,H95,H96,H97,H98
NAS	H84,H85,H86,H87,H88,H89,H90,H91,H92,H93
SAL	H114,H115

Wyznaczona ilość substytucji wynosiła 101, z czego 96 stanowiły tranzycje, 5 transwersje oraz stwierdzono 5 miejsc z insercją/delecją. Średnia liczba różnic pomiędzy haplotypami k wyniosła $7,59 \pm 3,55$, h przyjęło wartość $0,976 \pm 0,002$, a π $0,022 \pm 0,011$. Uzyskane frekwencje nukleotydowe wyglądały następująco: C: 17,87 %, T: 29,80 %, A: 43,06 %, G: 9,27 %. Wynik ten wskazuje na niski udział guaniny, co jest typowe dla genomu mitochondrialnego (Zhang i Hewitt, 1996).

Większość haplotypów była unikatowa dla danej lokalizacji i tak haplotypy występujące tylko w jednym miejscu stanowiły 76,6% (92 haplotypy) wszystkich stwierdzonych. Natomiast 26 haplotypów wystąpiło w dwóch bądź trzech lokalizacjach co stanowiło 21,6%. Jedynie dwa haplotypy H21 oraz H22 odnotowano odpowiednio w 5 i 7 różnych stanowiskach (Tabela 5).

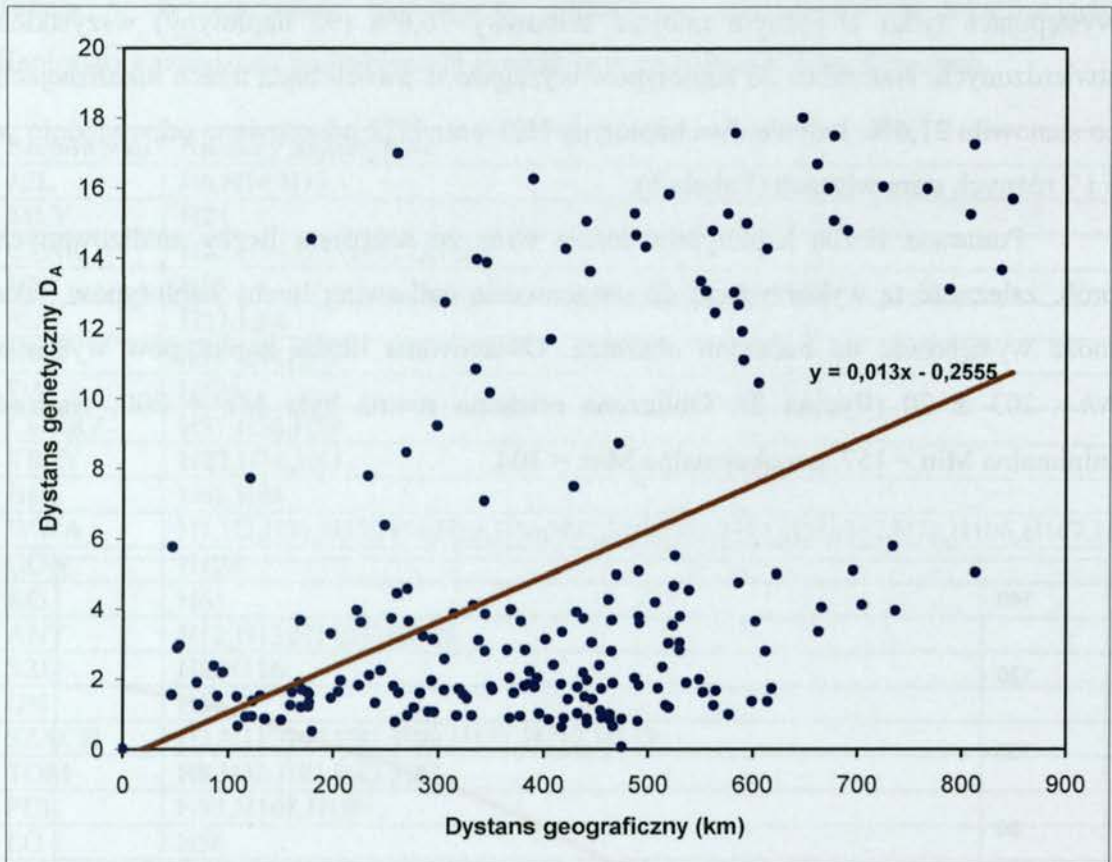
Ponieważ liczba haplotypów rośnie wraz ze wzrostem liczby analizowanych prób, zależność tą wykorzystano do oszacowania całkowitej liczby haplotypów, jaka może występować na badanym obszarze. Oszacowana liczba haplotypów wynosiła $Nh = 203 \pm 20$ (Rycina 2). Obliczona mediana równa była $Me = 200$, wartość minimalna $Min = 157$, a maksymalne $Max = 304$.



Rycina 2. Krzywa akumulacji zależności liczby wszystkich haplotypów (H) stwierdzonych w Polsce od liczby zanalizowanych prób (n).

Genetyczna struktura populacji gacków brunatnych

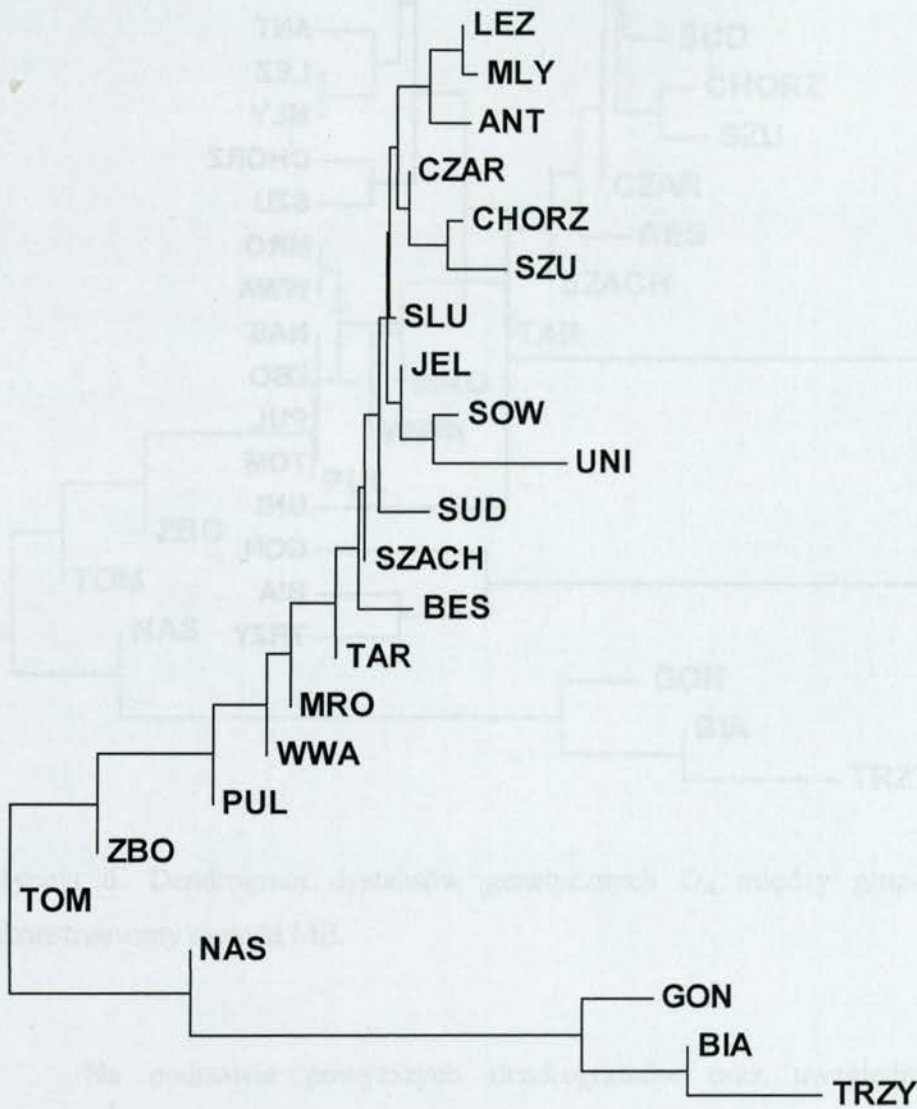
Przeprowadzony test Mantela na podstawie macierzy dystansu genetycznego D_A (Załącznik II) wykazał dodatnią korelację ($r = 0,45$, $n = 398$; $P \leq 0,001$; Rycina 3) między dystansem geograficznym a genetycznym, co wskazuje na zgodność z modelem izolacji przez dystans.



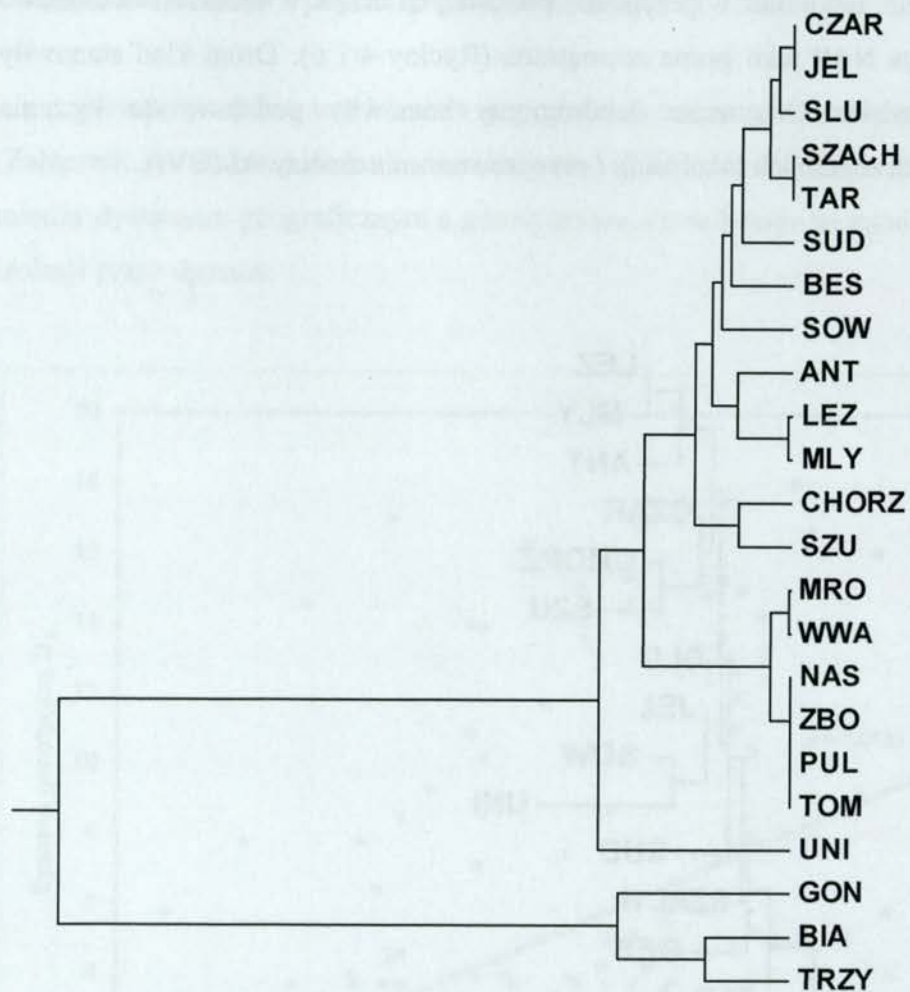
Rycina 3. Zależność między dystansami genetycznym D_A a geograficznym. Punkty oznaczają dystans między poszczególnymi parami stanowisk.

Także skonstruowane dendrogramy dystansów genetycznych D_A metodą N-J (Rycina 4), UPGMA (Rycina 5) oraz ME (Rycina 6) wskazały na istnienie związku między dystansem genetycznym D_A a odległością geograficzną. Wszystkie otrzymane drzewa pokazały podział na dwa główne kłady. Jednak na drzewie przy pogrupowaniu metodą UPGMA (Rycina 5) trzy grupy lokalne (GON, BIA, TRZY) znalazły się w

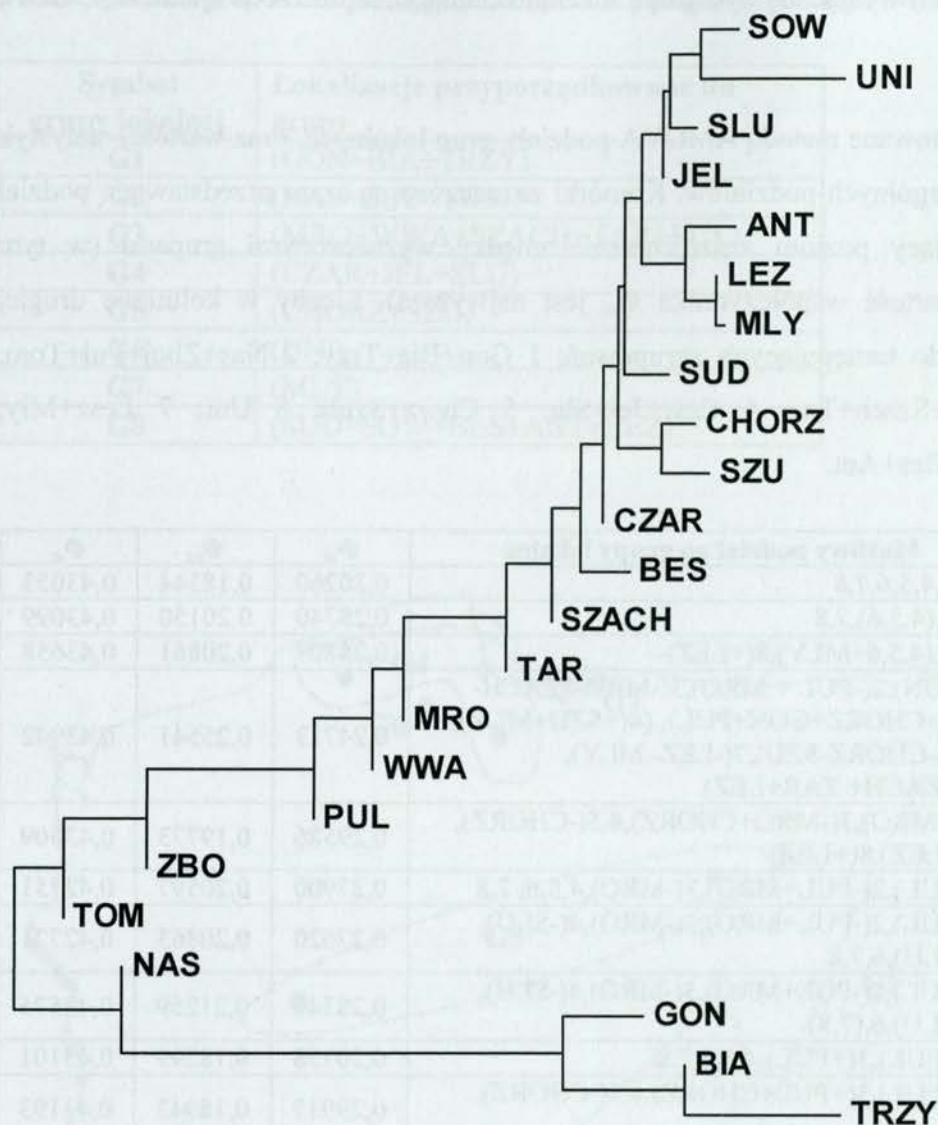
pierwszym kładzie, natomiast w przypadku pozostałych drzew w kładzie I dodatkowo znalazła się grupa NAS jako grupa zewnętrzna (Ryciny 4 i 6). Drugi kład stanowiły pozostałe stanowiska. Otrzymane dendrogramy stanowiły podstawę do łączenia osobników z poszczególnych lokalizacji i przeprowadzenia analizy AMOVA.



Rycina 4. Dendrogram dystansów genetycznych D_A między grupami lokalnymi skonstruowany metodą N-J.

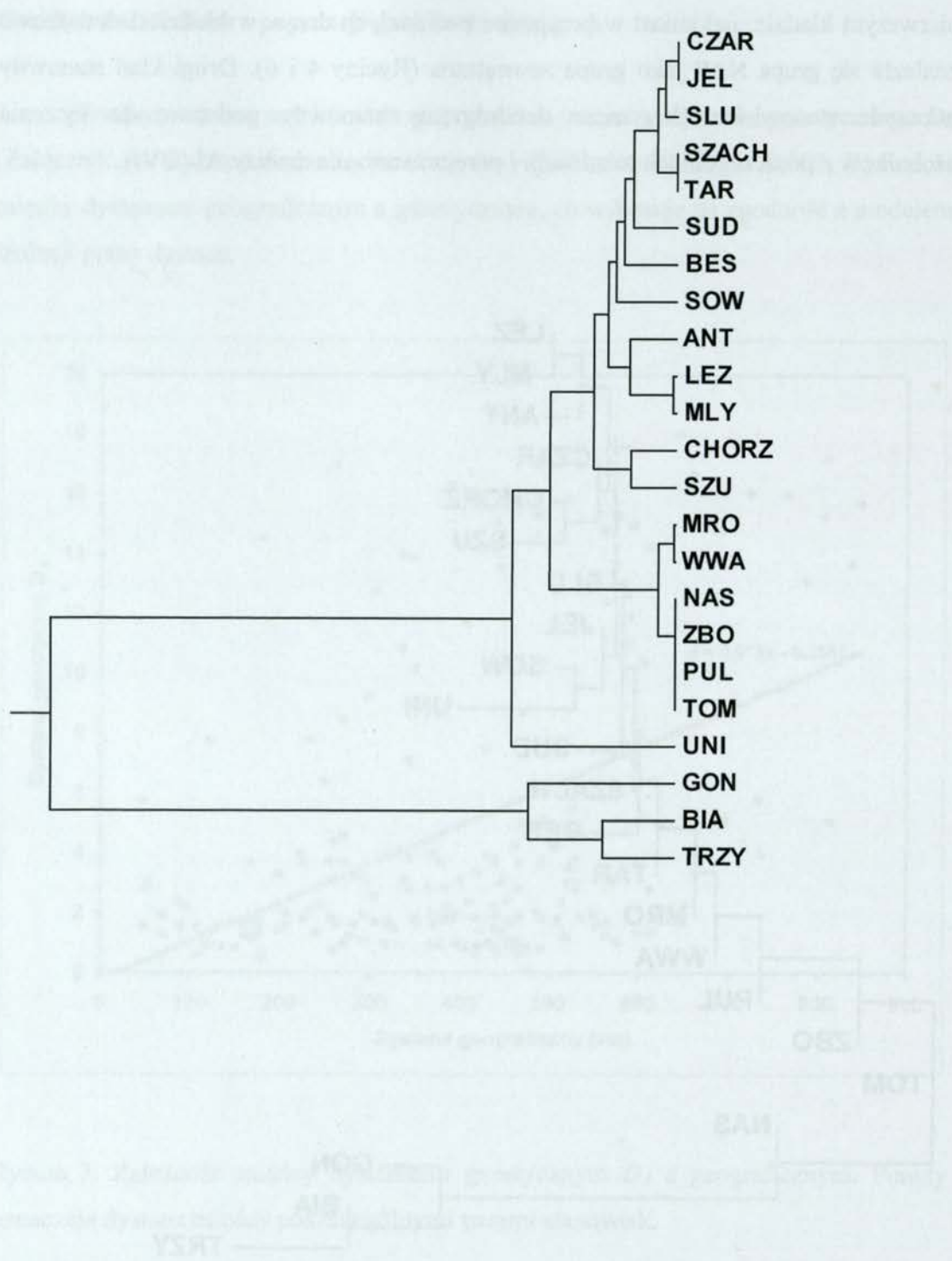


Rycina 5. Dendrogram dystansów genetycznych D_A między grupami lokalnymi skonstruowany metodą UPGMA.

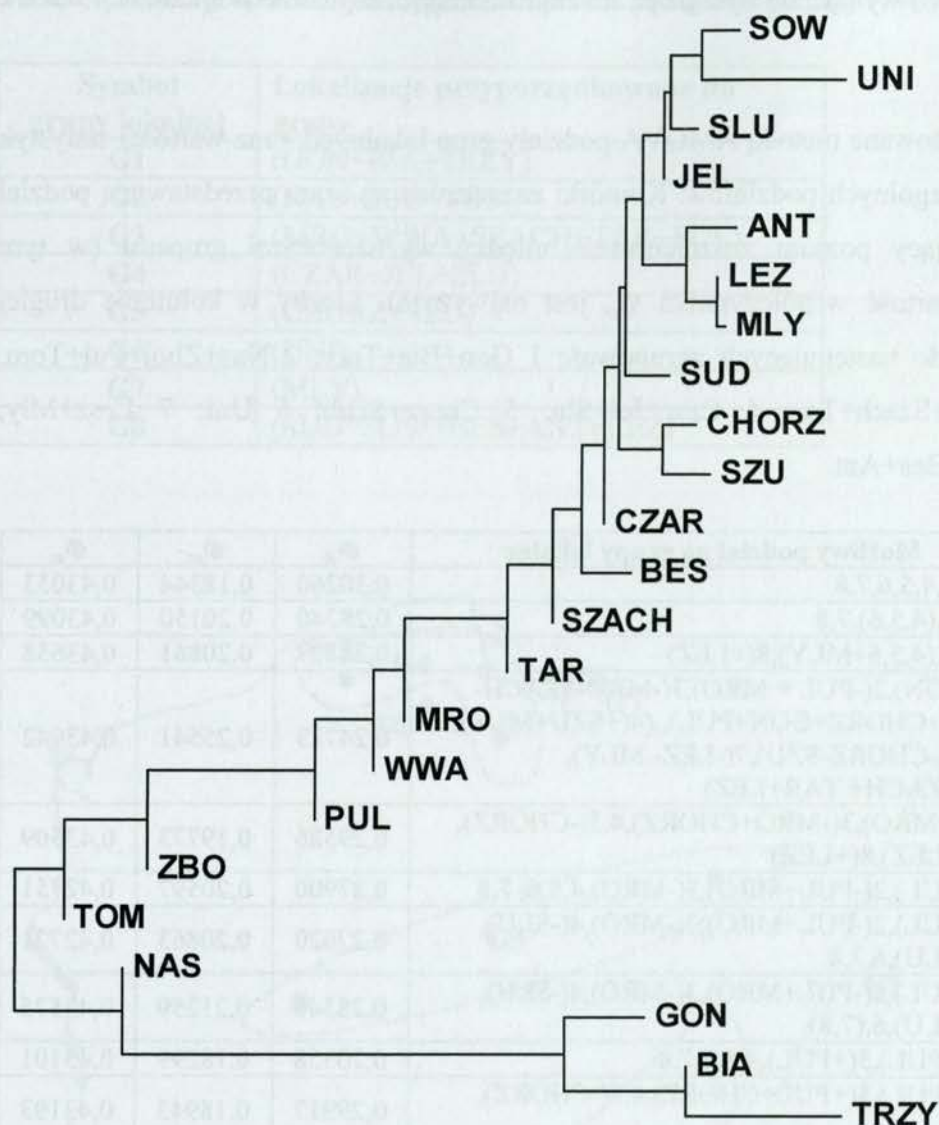


Rycina 6. Dendrogram dystansów genetycznych D_A między grupami lokalnymi skonstruowany metodą ME.

Na podstawie powyższych dendrogramów oraz uwzględniając bliskość geograficzną stanowisk, możliwe było łączenie jednostek na wiele sposobów. Podziały testowane metodą AMOVA przedstawia Tabela 6. Wszystkie przeprowadzone podziały były istotne statystycznie, uzyskane wartości współczynnika Φ_{ct} są bardzo zbliżone do siebie. Najwyższą wartość otrzymano w przypadku podziału populacji na osiem grup. Przeprowadzona analiza sugeruje więc istnienie ośmiu grup (oznaczonych G1–G8, dalej zwanymi grupami lokalnymi) skupiających osobniki z 23 stanowisk (Tabela 7, Rycina 7), przy czym grupą o największym dystansie genetycznym (w stosunku do pozostałych



Rycina 5. Dendrogram dystansów genetycznych D_A między grupami lokalnymi skonstruowany metodą UPGMA.



Rycina 6. Dendrogram dystansów genetycznych D_A między grupami lokalnymi skonstruowany metodą ME.

Na podstawie powyższych dendrogramów oraz uwzględniając bliskość geograficzną stanowisk, możliwe było łączenie jednostek na wiele sposobów. Podziały testowane metodą AMOVA przedstawia Tabela 6. Wszystkie przeprowadzone podziały były istotne statystycznie, uzyskane wartości współczynnika Φ_{ct} są bardzo zbliżone do siebie. Najwyższą wartość otrzymano w przypadku podziału populacji na osiem grup. Przeprowadzona analiza sugeruje więc istnienie ośmiu grup (oznaczonych G1–G8, dalej zwanymi grupami lokalnymi) skupiających osobniki z 23 stanowisk (Tabela 7, Rycina 7), przy czym grupą o największym dystansie genetycznym (w stosunku do pozostałych

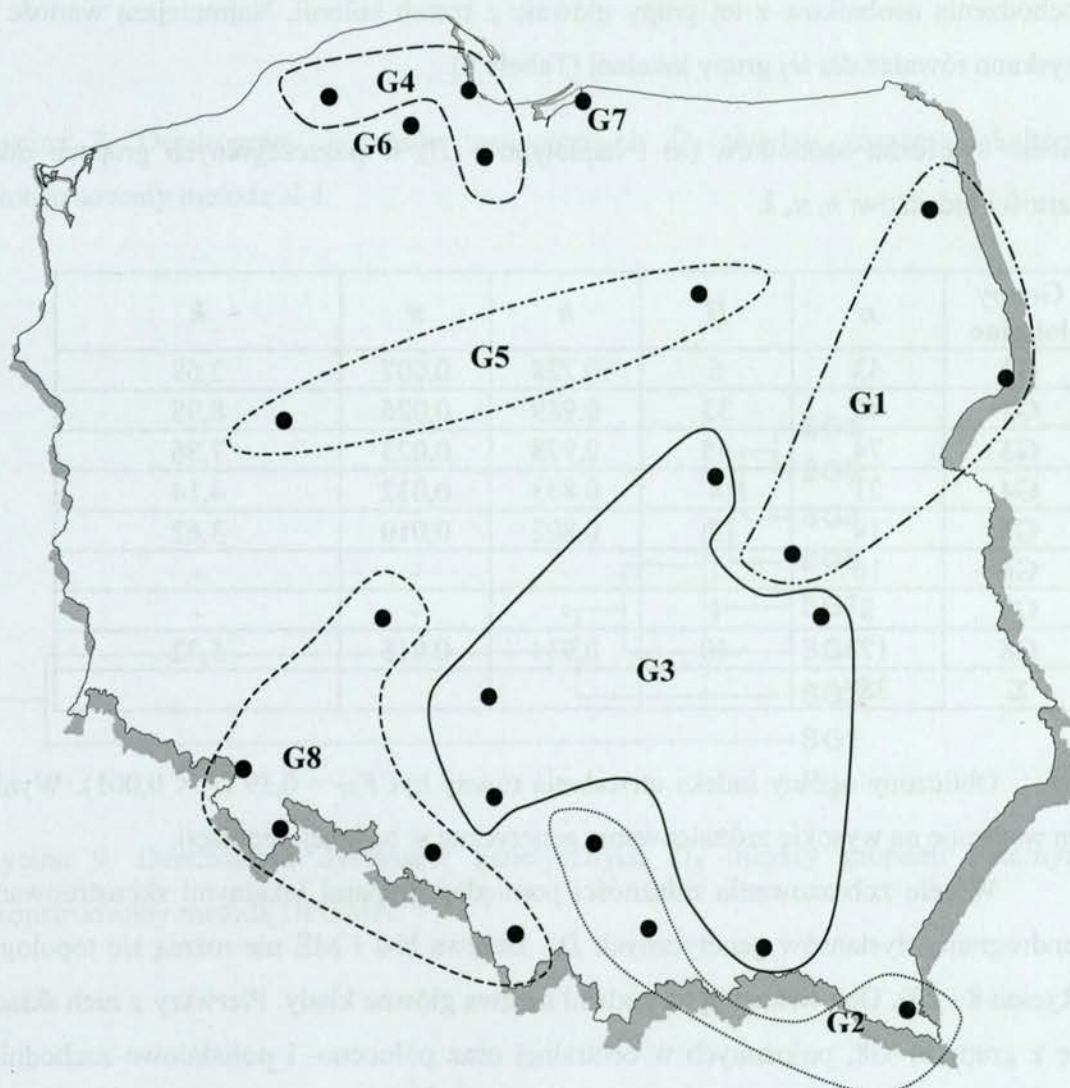
grup lokalnych) wydaje się być grupa lokalna składająca się z trzech lokalizacji: GON, BIA, TRZY.

Tabela 6. Testowane metodą AMOVA podziały grup lokalnych, oraz wartości statystyk Φ dla poszczególnych podziałów. Komórki zaznaczone na szaro przedstawiają podział maksymalizujący poziom zróżnicowania między wyznaczonymi grupami (w tym przypadku wartość współczynnika Φ_{ct} jest najwyższa). Liczby w kolumnie drugiej odnoszą się do następujących zgrupowań: 1 Gon+Bia+Trzy; 2 Nas+Zboj+Pul+Tom; 3 Mro+Waw+Szach+Tar; 4 Czar+Jel+Slu; 5 Chorz+Szub; 6 Uni; 7 Lesz+Mly; 8 Sud+Sow+Bes+Ant.

L.p.	Możliwy podział na grupy lokalne	Φ_{ct}	Φ_{sc}	Φ_{st}
1	1,2,3,4,5,6,7,8	0,30260	0,18344	0,43053
2	1,2,3,(4,5,6),7,8	0,28740	0,20150	0,43099
3	1,2,3,(4,5,6+MLY),8(+LEZ)	0,28807	0,20861	0,43658
4	1(-GON),2(-PUL + MRO),3(-MRO-SZACH-TAR+CHORZ+GON+PUL), (4(+SZU+MLY), 6), 5(-CHORZ-SZU),7(-LEZ- MLY), 8(+SZACH+ TAR+LEZ)	0,24713	0,25541	0,43942
5	1,2(+MRO),3(-MRO+CHORZ),4,5(-CHORZ), 6,7(-LEZ),8(+LEZ)	0,29586	0,19773	0,43509
6	1(+PUL),2(-PUL+MRO),3(-MRO),4,5,6, 7,8	0,27900	0,20597	0,42751
7	1(+PUL),2(-PUL+MRO),3(-MRO),4(-SLU), 5(+SLU),6,7,8	0,27620	0,20863	0,42721
8	1(+PUL),2(-PUL+MRO),3(-MRO),4(-SLU), 5(+SLU),6,(7,8)	0,28340	0,21259	0,43575
9	1,2(-PUL),3(+PUL),4,5,6,7,8	0,30358	0,18299	0,43101
10	1,2(-PUL),3(+PUL+CHORZ),4,5(-CHORZ), 6,7,8	0,29917	0,18943	0,43193
11	1,2(-PUL+MRO),3(+PUL-MRO),4,5,6,7,8	0,29956	0,18607	0,42989
12	1,2(-PUL),3(+PUL),4,5,6,7(-LEZ), 8(+LEZ)	0,30399	0,18939	0,43580
13	1,2(-PUL),3(+PUL),(4,5,6,7(-LEZ)), 8(+LEZ)	0,28899	0,20826	0,43707
14	1(+PUL),2(-PUL),3,4,5,6,7(-LEZ), 8(+LEZ)	0,28352	0,20851	0,43292
15	1(-GON),2(-PUL),3(+PUL+GON),4,5,6,7 (-LEZ), 8(+LEZ)	0,24038	0,24863	0,42925
16	1,2,3,(4,6),5,7,8	0,29283	0,19441	0,43031
17	1,2(-PUL),3(+PUL),(4,6,7(-LEZ)),5,8(+LEZ)	0,29332	0,20199	0,43606

Tabela 7. Skład grup lokalnych wyznaczonych na podstawie analizy AMOVA.

Symbol grupy lokalnej	Lokalizacje przyporządkowane do grupy
G1	(GON+BIA+TRZY)
G2	(NAS+ZBO+TOM)
G3	(MRO+WWA+SZACH+TAR+PUL)
G4	(CZAR+JEL+SLU)
G5	(CHORZ+SZU)
G6	(UNI)
G7	(MLY)
G8	(SUD+SOW+BES+ANT+LEZ)



Rycina 7. Przestrzenne rozmieszczenie 8 grup lokalnych na terenie kraju.

Największą liczebność w wyznaczonych grupach stwierdzono w G8, a liczba wyznaczonych haplotypów w tej grupie była druga co do wielkości i wynosiła 40. Po jednym haplocie stwierdzono w dwóch grupach G6 i G7, których liczebności również były niskie (odpowiednio 8 i 16 osobników). Największe wartości h stwierdzono dla grup lokalnych występujących na południu kraju (G2, G8), gdzie odławiano osobniki głównie podczas rojenia. Wynik ten jest zgodny z obliczonym h (0,976) dla wszystkich osobników odławianych w czasie rojenia (patrz rozdział Zróżnicowanie genetyczne dla trzech typów stanowisk). Równie wysoką wartość uzyskała grupa G3, której znaczną część stanowiły osobniki pozyskane podczas żerowania. Najmniejsze zróżnicowanie zarówno haplotypowe, jak i nukleotydowe stwierdzono dla G1 w grupie tej dla 43 osobników zaobserwowano jedynie 6 haplotypów. Tak niskie wartości są wynikiem pochodzenia osobników z tej grupy głównie z trzech kolonii. Najmniejszą wartość k uzyskano również dla tej grupy lokalnej (Tabela 8).

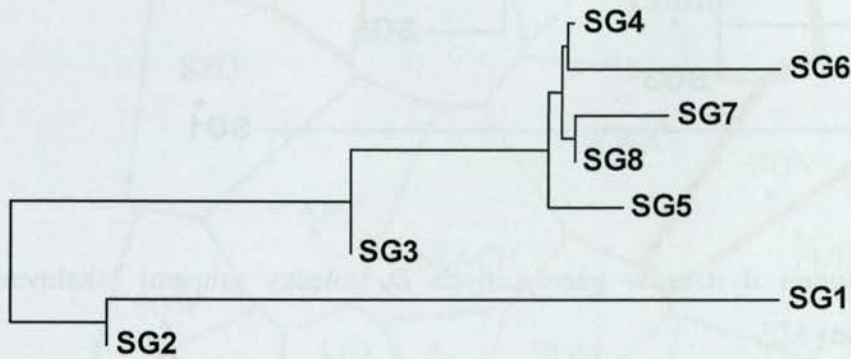
Tabela 8. Liczba osobników (n) i haplotypów (H) w poszczególnych grupach oraz wartości indeksów: h , π , k .

Grupy lokalne	n	H	h	π	k
G1	43	6	0,728	0,007	2,68
G2	40	33	0,989	0,026	8,98
G3	74	45	0,978	0,023	7,86
G4	21	8	0,833	0,012	4,14
G5	14	5	0,802	0,010	3,62
G6	16	1	-	-	-
G7	8	1	-	-	-
G8	171	40	0,934	0,015	5,32
Σ	387				

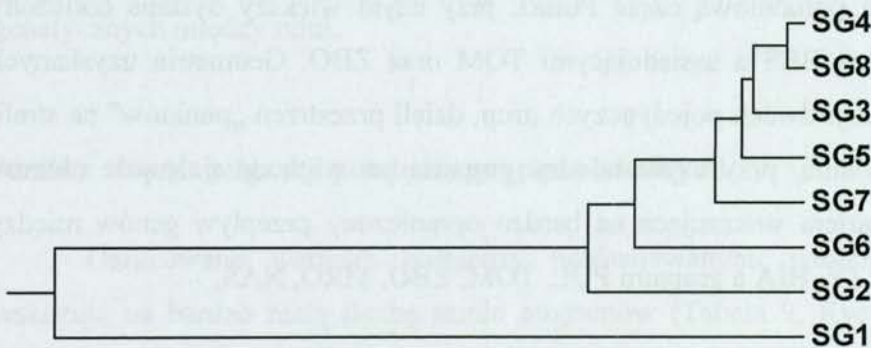
Obliczony ogólny indeks utrwalenia równy był $F_{ST} = 0,39$ ($P < 0,001$). Wynik ten wskazuje na wysokie zróżnicowanie genetyczne w badanej populacji.

W celu zobrazowania zależności pomiędzy grupami lokalnymi skonstruowano dendrogramy dystansów genetycznych D_A . Drzewa N-J i ME nie różnią się topologią (Rycina 8 i 10). Oba wskazują na podział na dwa główne kłady. Pierwszy z nich składa się z grup G4–G8, położonych w centralnej oraz północno- i południowo-zachodniej części kraju. Grupa G3 zajmuje zewnętrzną pozycję w stosunku do tego kładu. Drugi kład składa się z dwóch grup G1 oraz G2. Dendrogram skonstruowany metodą UPGMA

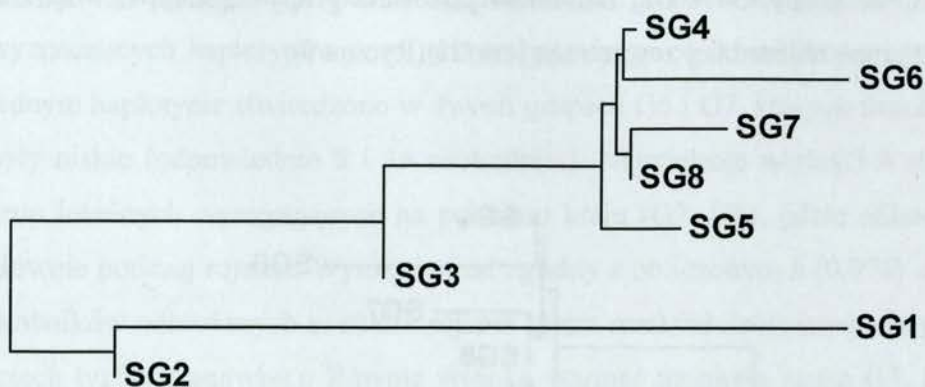
również łączy dwie grupy G4 i G8, natomiast pozostałe grupy zajmują zewnętrzne pozycje z czego grupą najbardziej zewnętrzną jest G1 (Rycina 9).



Rycina 8. Dendrogram dystansów genetycznych D_A między grupami lokalnymi skonstruowany metodą N-J.

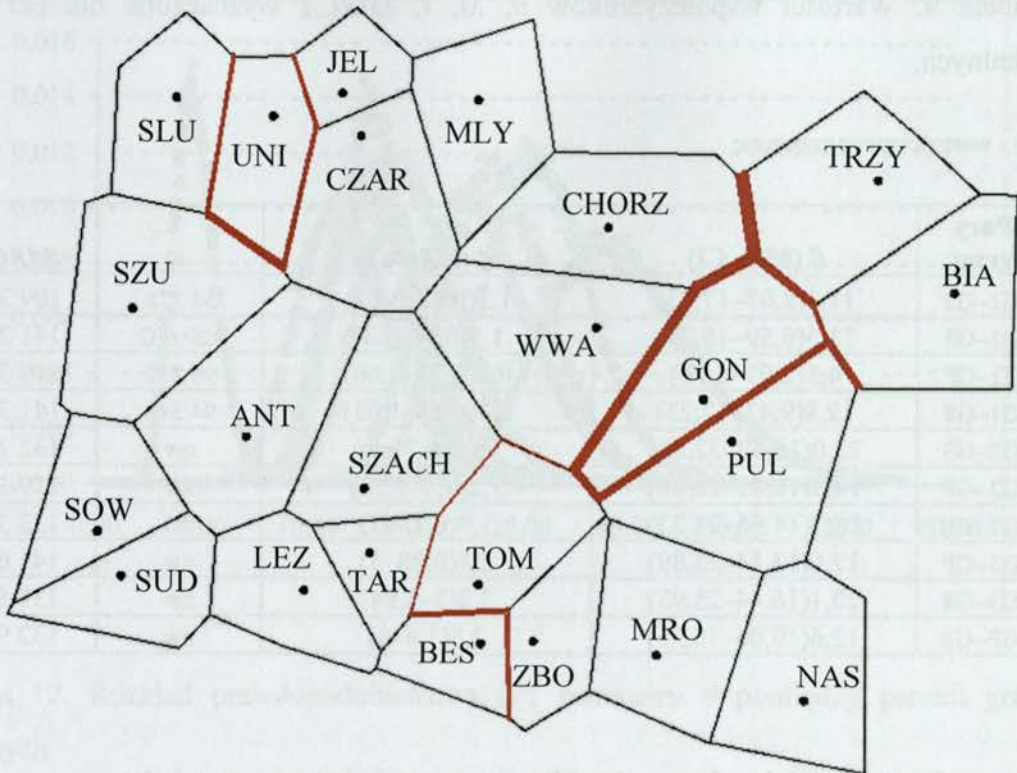


Rycina 9. Dendrogram dystansów genetycznych D_A między grupami lokalnymi skonstruowany metodą UPGMA.



Rycina 10. Dendrogram dystansów genetycznych D_A między grupami lokalnymi skonstruowany metodą ME.

Analiza z wykorzystaniem algorytmu Monmoniera pozwoliła na zidentyfikowanie barier w przepływie genów pomiędzy stanowiskami. Pierwsza bariera wyliczona na podstawie macierzy dystansów genetycznych D_A oddziela trzy stanowiska we wschodniej części kraju (TRZY, GON, BIA) od pozostałych (Rycina 11). W grupie tych stanowisk kolejna bariera ogranicza lokalizację GON izolując ją od dwóch pozostałych; podobnie UNI została ograniczona barierą od wszystkich sąsiadujących. Inna bariera dzieli południową część Polski, przy czym większy dystans obliczony został między grupą BES a sąsiadującymi TOM oraz ZBO. Geometria uzyskanych barier, oprócz izolacji dwóch pojedynczych grup, dzieli przestrzeń „punktów” na strefę wschodnią i zachodnią, przy czym między grupami po wschodniej stronie obszaru występuje silna bariera wskazująca na bardzo ograniczony przepływ genów między grupami GON, TRZY, BIA a grupami PUL, TOM, ZBO, MRO, NAS.



Rycina 11. Analiza algorytmu Monmoniera. Czarne linie reprezentują wieloboki Voronoi'a, czerwone odpowiadają zidentyfikowanym barierom genetycznym pomiędzy grupami lokalnymi, a ich grubość jest proporcjonalna do wielkości dystansów genetycznych między nimi.

Analiza stopnia migracji pomiędzy grupami lokalnymi

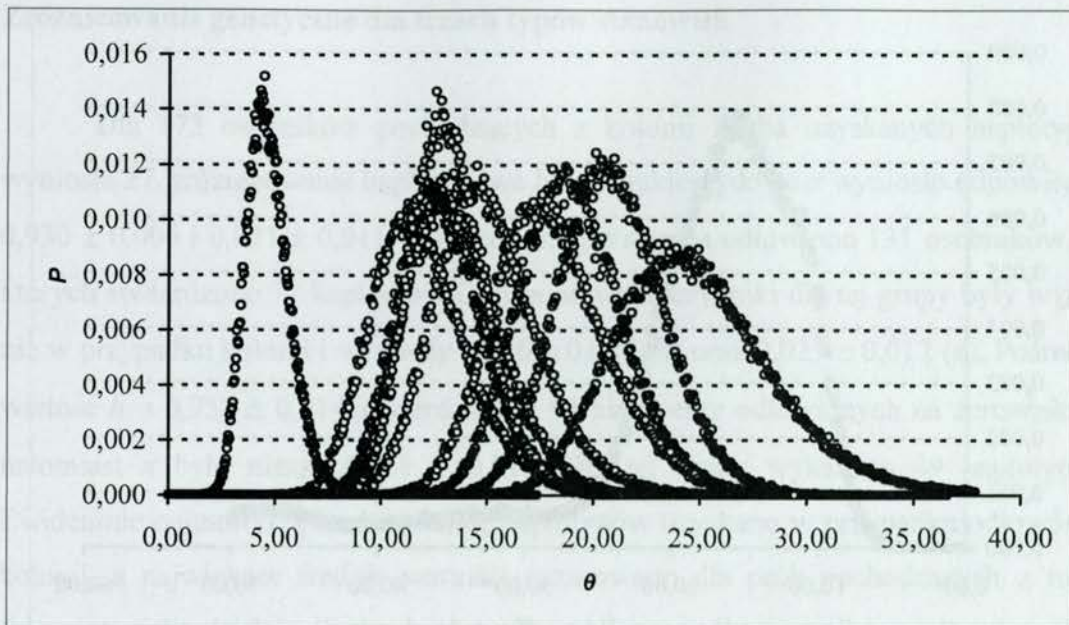
Oszacowane wartości pomiędzy porównywanymi parami grup lokalnych wskazują na bardzo małą liczbę samic migrantów (Tabela 9, Rycina 13). Najniższe wartości (od 0,2 do 1,5 migranta na pokolenie) uzyskano w przypadku porównania grupy G1 z pozostałymi grupami. Najwyższą liczbę migrantów (15,3 osobnika na pokolenie) oszacowano pomiędzy grupami z południowego i centralnego obszaru kraju (G2–G3). Dla tej analizy nie można było oszacowanie górnego przedziału ufności, ponieważ wykres prawdopodobieństwa nie osiągnął wartości zero (Rycina 14). Współczynnik efektywnej wielkości populacji skalowany przez tempo mutacji zawiera się w przedziale 4,5–23, jednak uzyskane przedziały ufności w większości przypadków pokrywają się w zakresach, z wyjątkiem analizy generującej najmniejszą wartość (Rycina 12).

Tabela 9. Wartości współczynników θ , M , t , $tMRCA$ wyznaczone dla par grup lokalnych.

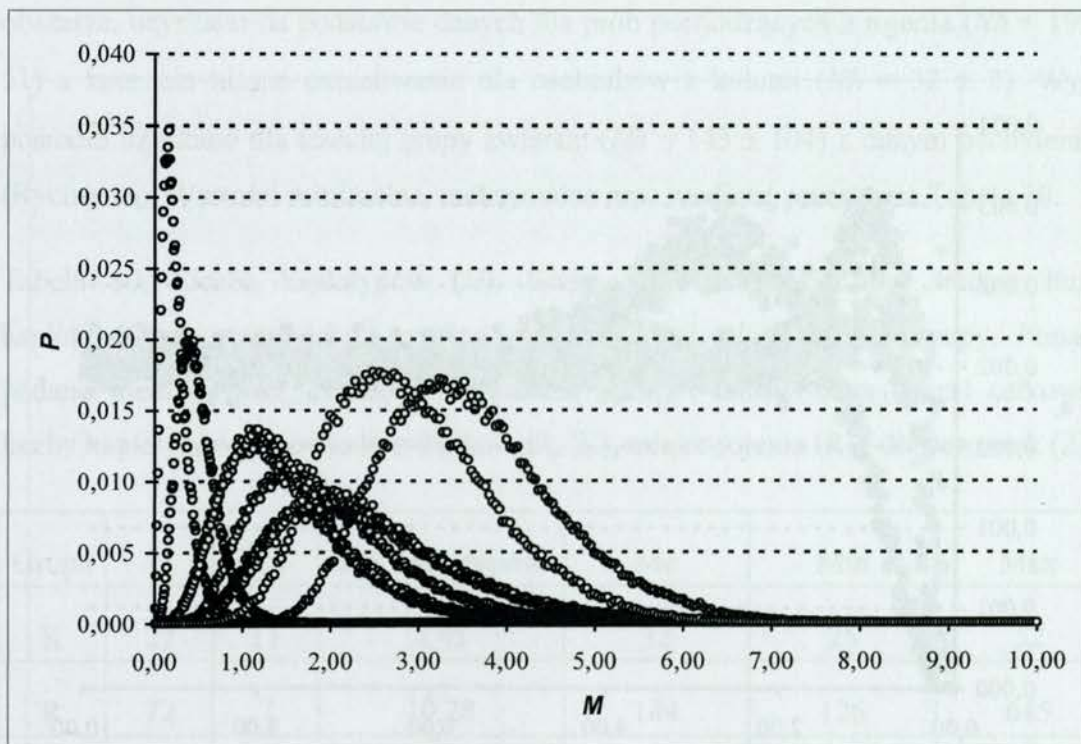
nw - wartości niewyznaczone

Pary grup	θ (95% CI)	M (95% CI)	t	$tMRCA$
G1-G2	11,3(8,07-17,03)	1,2(0,48-3,52)	54 278	109 337
G1-G3	13,5(9,59-18,29)	1,5(0,74-4,1)	129 602	141 217
G1-GP	4,5(2,97-6,96)	0,2(0,05-0,66)	90 852	119 313
G1-G8	12,8(9,43-17,23)	0,4(0,16-1,03)	94 348	141 341
G2-G3	23,0(18,62-32,86)	15,3(8,7-nw)	nw	132 774
G2-GP	14,5(10,85-20,48)	1,2(0,5-3,28)	nw	119 157
G2-G8	18,7(14,66-24,23)	1,8(0,88-5)	nw	132 318
G3-GP	17,6(13,34-23,89)	2,1(0,88-5)	nw	141 611
G3-G8	20,1(16,44-25,93)	3,2(2-5,84)	nw	137 844
GP-G8	12,6(10,06-16,95)	2,5(1,4-5)	nw	132 980

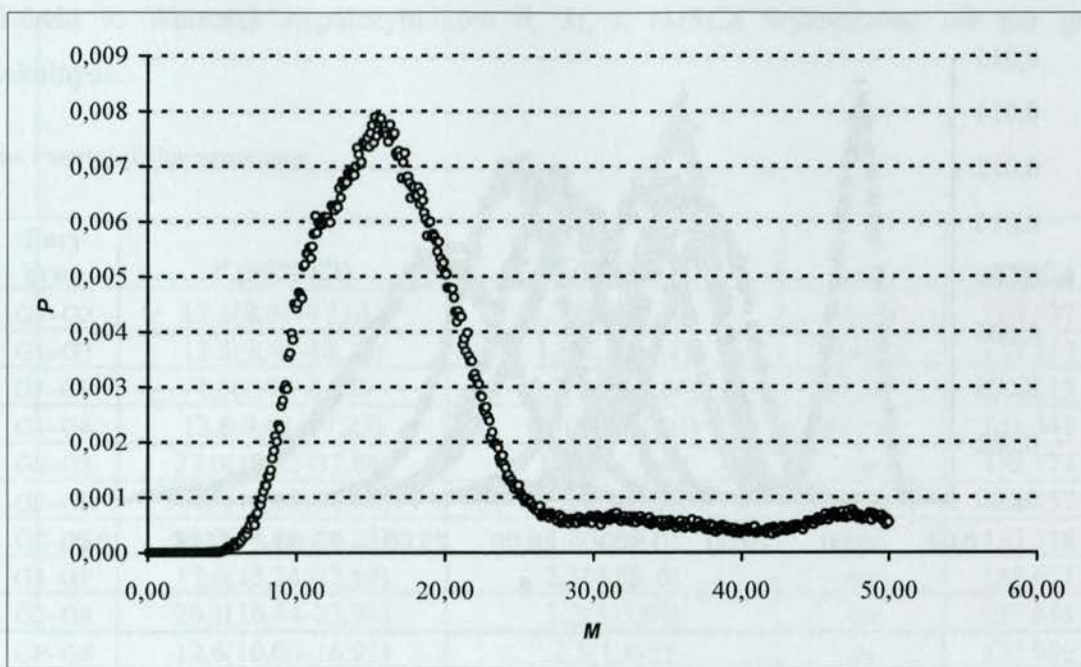
Czas rozejścia się grup obliczony został jedynie pomiędzy grupą G1 a pozostałymi grupami lokalnymi (Tabela 9, Rycina 15), ze względu na jednorodny rozkład prawdopodobieństwa parametru T dla pozostałych analiz. Najkrótszy okres dywergencji pomiędzy dwoma grupami obliczony został w przypadku osobników z obszaru wschodniego i południowego Polski (G1-G2). Czas jaki upłynął od posiadania wspólnego przodka powinien być zawsze dłuższy od czasu dywergencji populacji. Uzyskane wyniki dla $tMRCA$ mieszczą się w przedziale od 109 337 lat (dla grup G1-G2) do 141 611 lat (dla grup G3-GP), i są wyższe niż czas dywergencji osobników dla analogicznych par regionów.



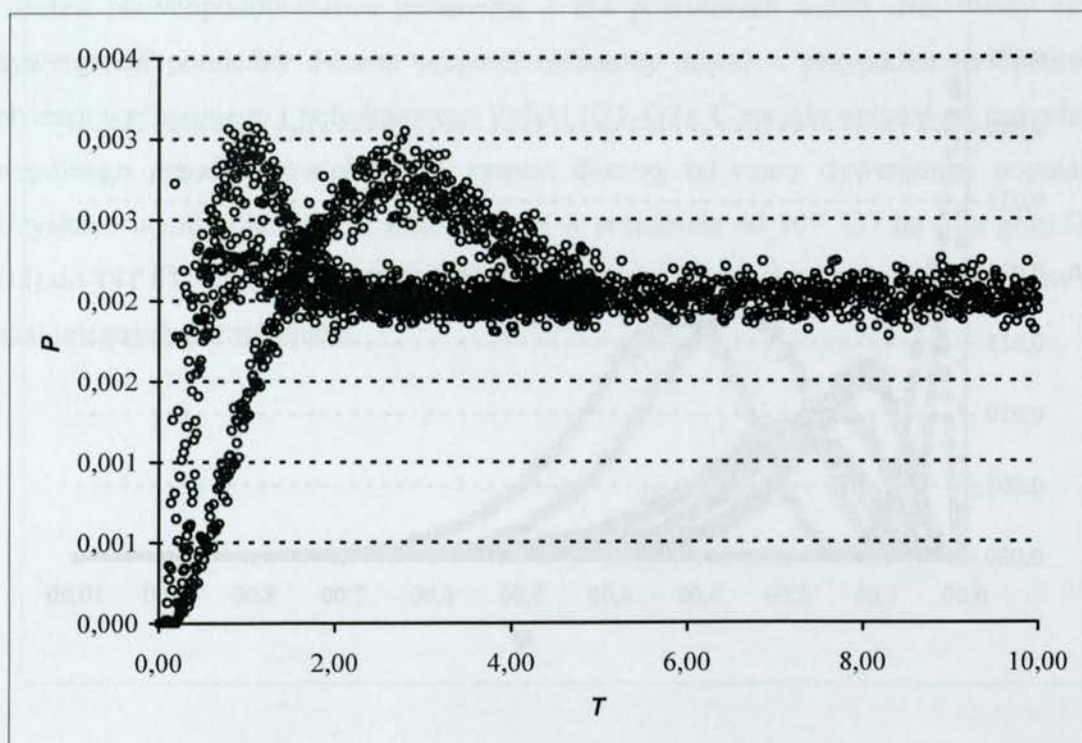
Rycina 12. Rozkład prawdopodobieństwa (P) parametru θ pomiędzy parami grup lokalnych.



Rycina 13. Rozkład prawdopodobieństwa (P) parametru M pomiędzy parami grup lokalnych (oprócz grup G2–G3).



Rycina 14. Rozkład prawdopodobieństwa (P) parametru M pomiędzy grupami G2–G3.



Rycina 15. Rozkład prawdopodobieństwa (P) parametru T pomiędzy czterema parami grup lokalnych.

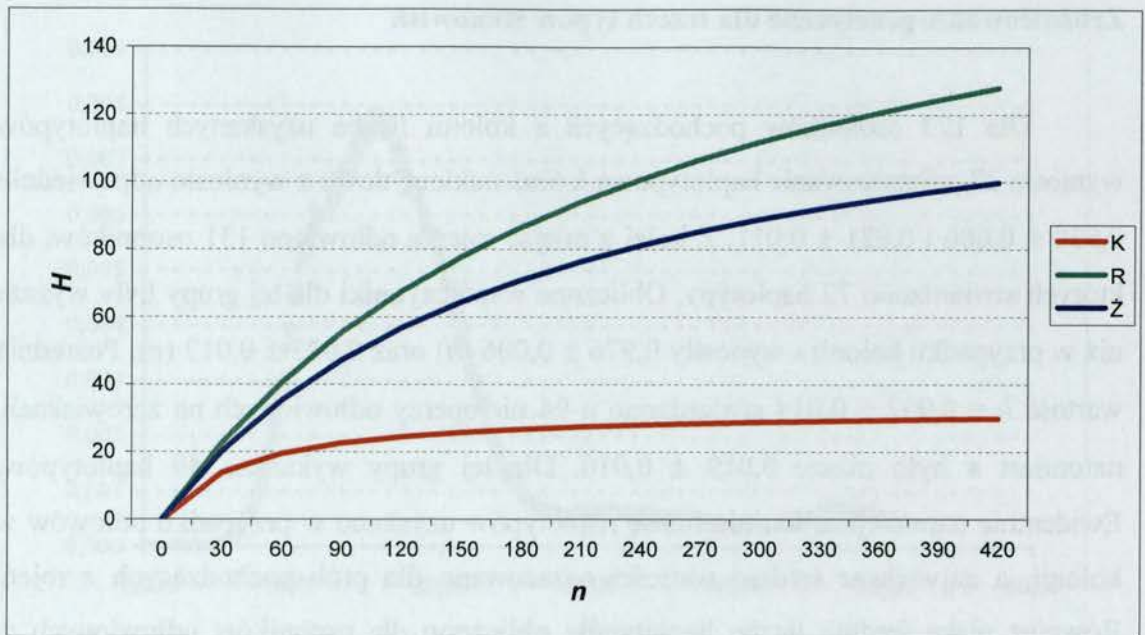
Zróżnicowanie genetyczne dla trzech typów stanowisk

Dla 173 osobników pochodzących z kolonii liczba uzyskanych haplotypów wyniosła 27, zróżnicowanie haplotypowe h oraz nukleotydowe π wyniosło odpowiednio $0,930 \pm 0,006$ i $0,021 \pm 0,011$. Z kolei z miejsc rojenia odłowiono 131 osobników, dla których stwierdzono 72 haplotypy. Obliczone współczynniki dla tej grupy były wyższe niż w przypadku kolonii i wynosiły $0,976 \pm 0,006$ (h) oraz $0,023 \pm 0,012$ (π). Pośrednią wartość $h = 0,952 \pm 0,014$ stwierdzono u 94 nietoperzy odłowionych na żerowiskach, natomiast π było niższe $0,019 \pm 0,010$. Dla tej grupy wykazano 49 haplotypów. Ewidentnie najmniejszą średnią liczbę haplotypów uzyskano w przypadku odłowów w kolonii, a największe średnie wartości oszacowano dla prób pochodzących z rojeń. Również niską średnią liczbę haplotypów obliczono dla osobników odłowionych w czasie żerowania, jednak znaczny wpływ na uzyskany wynik miała duża liczba stanowisk w jakich odłowy miały miejsce (Tabela 10).

Najwyższą wartość całkowitej liczby haplotypów, jaka może występować na badanym obszarze, uzyskano na podstawie danych dla prób pochodzących z rojenia ($Nh = 199 \pm 51$) a znacznie niższe oszacowanie dla osobników z kolonii ($Nh = 32 \pm 2$). Wynik pośredni uzyskano dla trzeciej grupy zwierząt ($Nh = 143 \pm 104$) z dużym odchyleniem (Rycina 16). Wartości minimalne, maksymalne oraz medianę przedstawia Tabela 10.

Tabela 10. Liczba haplotypów (H), liczba stanowisk (NS) oraz średnia liczba haplotypów na stanowisko, uzyskane w zależności od charakteru grupy. Ponadto podano medianę (Me), wartości minimalną (Min) i maksymalną (Max) całkowitej liczby haplotypów odpowiednio dla kolonii; (K), miejsc rojenia (R) i dla żerowisk (Ż).

Grupa	H	NS	śr l. haplotypów	Me	Min	Max
K	27	11	2,45	32	26	52
R	72	7	10,28	184	126	645
Ż	49	17	2,88	125	77	2686

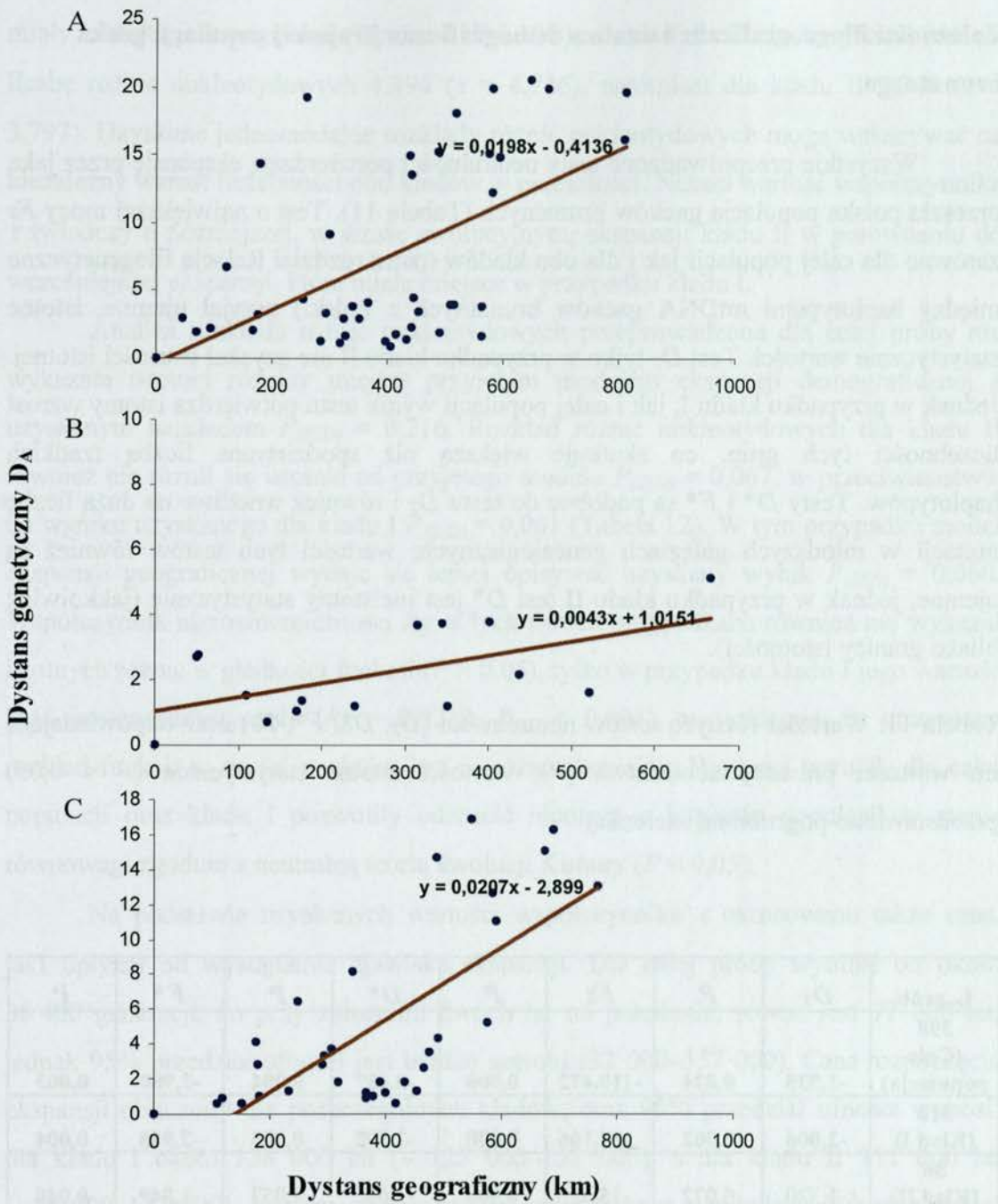


Rycina 16. Krzywa akumulacji zależności liczby haplotypów (H) stwierdzonych w koloniach nietoperzy (K), miejscach rojenia (R) i żerowania (Z) od liczby przeanalizowanych prób (n).

Przeprowadzony test Mantela na podstawie macierzy dystansu genetycznego D_A pomiędzy koloniami letnimi wykazał dodatnią korelację ($r = 0,55$, $P < 0,001$; Rycina 17A) między dystansami geograficznym a genetycznym. Wskazuje to na zgodność z modelem izolacji przez dystans między badanymi koloniami rozrodczymi. Również w przypadku osobników pochodzących z miejsc rojenia i żerowisk test ten wykazał dodatnią, istotną statystycznie zależność, jakkolwiek nieco niższe współczynniki korelacji (odpowiednio $r = 0,50$, $P < 0,05$ i $r = 0,46$, $P < 0,001$; Rycina 17B i C).

Grupa	n	H	n	H	n	H
K	30	15	60	20	90	22
R	30	25	60	45	90	60
Z	30	20	60	35	90	48

Rycina 15. Krzywa akumulacji zależności (P) pomiędzy 7 próbkami z kolonii nietoperzy a miejscami rojenia i żerowania.



Rycina 17. Zależność między dystansami genetycznym D_A a geograficznym pomiędzy
 A) koloniami rozrodczymi, B) miejscami rojenia, C) miejscami żerowania.

Zależności filogeograficzne i analiza demograficzna krajowej populacji gacka brunatnego

Wszystkie przeprowadzone testy neutralności potwierdzają ekspansję przez jaką przeszła polska populacja gacków brunatnych (Tabela 11). Test o największej mocy F_s zarówno dla całej populacji jak i dla obu kładów (patrz rozdział Relacje filogenetyczne między haplotypami mtDNA gacków brunatnych z Polski) przyjął ujemne, istotne statystycznie wartości. Test D_T tylko w przypadku kładu II nie uzyskał wartości istotnej. Jednak w przypadku kładu I, jak i całej populacji wynik testu potwierdza istotny wzrost liczebności tych grup, co skutkuje większą niż spodziewana liczbą rzadkich haplotypów. Testy D^* i F^* są podobne do testu D_T i również wrażliwe na dużą liczbę mutacji w młodszych gałęziach genealogicznych; wartości tych testów również są ujemne, jednak w przypadku kładu II test D^* jest nieistotny statystycznie (jakkolwiek blisko granicy istotności).

Tabela 11. Wartości różnych testów neutralności (D_T , D^* , F^* , F_s) oraz odpowiadające im wartości prawdopodobieństwa (P); wartości istotne statystycznie ($P < 0,05$) przedstawiono pogrubioną czcionką.

L. prób	D_T	P	F_s	P	D^*	P	F^*	P
398 (Cała populacja)	-1,535	0,024	-110,472	0,000	-3,437	0,004	-2,980	0,003
312 (Kład I)	-2,006	0,002	-34,166	0,000	-2,892	0,005	-2,955	0,004
86 (Kład II)	-1,320	0,072	-15,435	0,000	-1,686	0,057	-1,849	0,048

Hipotezę dywergencji na dwa główne kłady potwierdziła również analiza rozkładu różnic nukleotydowych (*mismatch distribution*). Rozkład obliczony dla całej polskiej populacji gacków brunatnych był dwumodalny (Rycina 18A). Jeden z pików odpowiada sumie różnic nukleotydowych pomiędzy tymi dwoma kładami (~15 różnic nukleotydowych), natomiast drugi pik odpowiada liczbie różnic nukleotydowych między haplotypami w obrębie kładów (~6 różnic nukleotydowych). Uzyskany wynik może sugerować ekspansję, która miała miejsce w przeszłości, z dwóch odrębnych refugium postglacjalnych. Rozkłady wygenerowane dla obu kładów indywidualnie

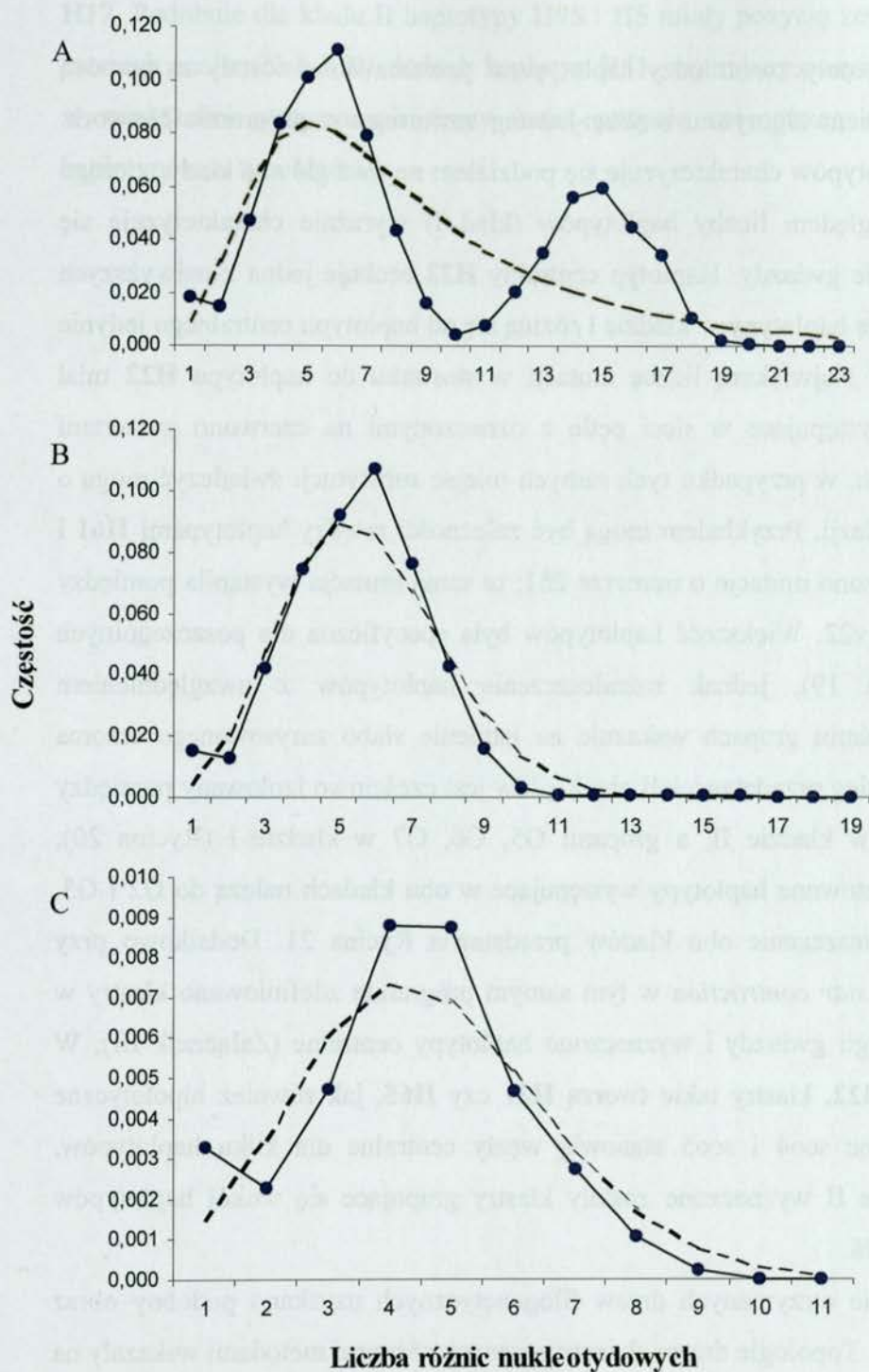
miały kształty jednomodalne (Rycina 18B i 18C); rozkład dla kladu I wykazał średnia liczbę różnic nukleotydowych 4,494 ($\tau = 4,746$), natomiast dla kladu II 3,348 ($\tau = 3,797$). Uzyskane jednomodalne rozkłady różnic nukleotydowych mogą wskazywać na niezależny wzrost liczebności obu kładów w przeszłości. Niższa wartość współczynnika τ świadczy o późniejszej, w sensie ewolucyjnym, ekspansji kladu II w porównaniu do wcześniejszej ekspansji, która miała miejsce w przypadku kladu I.

Analiza rozkładu różnic nukleotydowych przeprowadzona dla całej próby nie wykazała istotnej różnicy między przyjętym modelem ekspansji demograficznej a uzyskanym rozkładem $P_{(SSD)} = 0,216$. Rozkład różnic nukleotydowych dla kladu II również nie różnił się istotnie od przyjętego modelu $P_{(SSD)} = 0,067$, w przeciwieństwie do wyniku uzyskanego dla kladu I $P_{(SSD)} = 0,001$ (Tabela 12). W tym przypadku model ekspansji geograficznej wydaje się lepiej opisywać uzyskany wynik $P_{(SSD)} = 0,060$. Współczynnik nierównomierności R_g w tych dwóch przypadkach również nie wykazał istotnych różnic w gładkości funkcji ($P > 0,05$), tylko w przypadku kladu I jego wartość była istotna statystycznie ($R_g = 0,0230$, $P_{(R_g)} < 0,001$), co wskazuje, że otrzymany rozkład funkcji w części punktów jest nieróżniczkowalny. Wartości testu R_2 dla całej populacji oraz kladu I pozwoliły odrzucić hipotezę o istnieniu populacji w stanie równowagi zgodnie z neutralną teorią ewolucji Kimury ($P < 0,05$).

Na podstawie uzyskanych wartości współczynnika τ oszacowano także czas, jaki upłynął od wystąpienia zjawiska ekspansji. Dla całej próby wyniósł on około 38 400 generacji, co przy założeniu dwóch lat na pokolenie, równe jest 77 000 lat, jednak 95% przedział ufności jest bardzo szeroki (32 000–357 000). Czas rozpoczęcia ekspansji obliczony dla poszczególnych kładów, oraz 95% przedział ufności wynosi: dla kladu I około 138 000 lat (~ 125 000–151 000), a dla kladu II 111 000 lat (~ 55 000–147 000). Poziom zróżnicowania genetycznego pomiędzy kładami wyniósł 3,8%.

Tabela 12. Wyniki statystyk analizy rozkładu różnic nukleotydowych; wartości współczynników k , w nawiasach kwadratowych wartości minimalne oraz maksymalne; wartości statystyk θ_0 , θ_1 , τ , w nawiasach normalnych podano zakres przedziałów ufności przy $\alpha=0,01$; wartości sumy kwadratów odchyłeń (SSD) dla modelu ekspansji demograficznej (D) i geograficznej (G), wyniki współczynników nierównomierności R_g i R_2 ; w nawiasach klamrowych podano prawdopodobieństwa tych statystyk.

L. prób	k	θ_0	θ_1	τ	$SSD(D)$ $P_{(SSD)}$	$SSD(G)$ $P_{(SSD)}$	R_g $P_{(R_g)}$	R_2 $P_{(R_2)}$
398 (Cała populacja)	7,59 [3,48–18,34]	5,10 (0,00–17,19)	99999 (14,84–99999)	2,63 (0,81–16,16)	0,017 {0,216}	0,017 {0,138}	0,012 {0,136}	0,036 {0,031}
312 (Kład I)	4,49 [4,29–5,47]	0,00 (0,00–0,56)	99999 (60,25–99999)	4,74 (4,24–5,42)	0,004 {0,001}	0,004 {0,060}	0,023 {0,000}	0,025 {0,010}
86 (Kład II)	3,34 [2,30–5,21]	0,00 (0,00–2,12)	46,01 (9,52–99999)	3,79 (1,52–5,43)	0,010 {0,067}	0,007 {0,368}	0,035 {0,124}	0,054 {0,082}



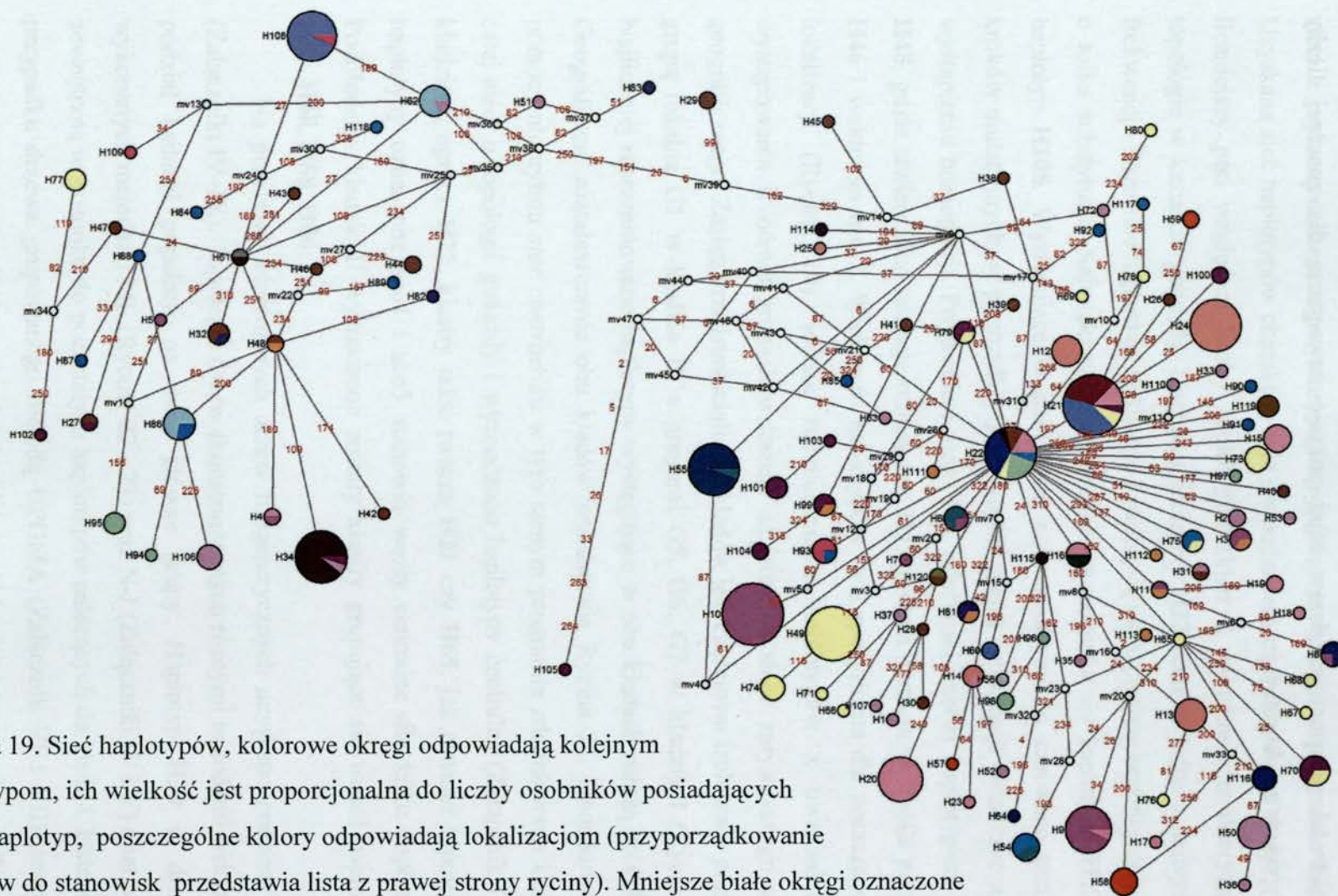
Rycina 18. Rozkład różnic nukleotydowych (linia ciągła) w przypadku A) całej analizowanej próby, B) w kładzie I i C) w kładzie II. Linia przerywana oznacza oczekiwany rozkład różnic nukleotydowych.

Relacje filogenetyczne między haplotypami mtDNA gacków brunatnych z Polski

Relacje filogenetyczne między haplotypami przedstawione zostały za pomocą sieci z wykorzystaniem algorytmu *median-joining* zawartego w programie Network. Uzyskana sieć haplotypów charakteryzuje się podziałem na dwa główne kłady, z czego liczniejszy pod względem liczby haplotypów (klad I) wyraźnie charakteryzuje się topologią w kształcie gwiazdy. Haplotyp centralny **H22** cechuje jedna z najwyższych frekwencji. Pozostałe haplotypy w kładzie I różnią się od haplotypu centralnego jedynie o kilka substytucji. Największą liczbę mutacji w stosunku do haplotypu **H22** miał haplotyp **H105**. Występujące w sieci pętle z oznaczonymi na czerwono numerami kroków mutacyjnych, w przypadku tych samych miejsc substytucji świadczyć mogą o wystąpieniu homoplazji. Przykładem mogą być zależności między haplotypami **H61** i **H48**, gdzie stwierdzono mutacje o numerze 251; ta sama mutacja wystąpiła pomiędzy **H46** i wektorem mv22. Większość haplotypów była specyficzna dla poszczególnych lokalizacji (Rycina 19), jednak rozmieszczenie haplotypów z uwzględnieniem występowania w ośmiu grupach wskazuje na istnienie słabo zarysowanego wzorca geograficznego. Zasięg przedstawicieli obu kładów jest częściowo izolowany pomiędzy grupą lokalną G1 w kładzie II, a grupami G5, G6, G7 w kładzie I (Rycina 20). Najliczniej reprezentowane haplotypy występujące w obu kładach należą do G2 i G3. Geograficzne rozmieszczenie obu kładów przedstawia Rycina 21. Dodatkowo przy pomocy algorytmu *star contraction* w tym samym programie zdefiniowano klastry w całej sieci o topologii gwiazdy i wyznaczono haplotypy centralne (Załącznik III). W kładzie I, oprócz **H22**, klastry takie tworzą **H21** czy **H65**, jak również hipotetyczne haplotypy oznaczone sco4 i sco5 stanowią węzły centralne dla kilku haplotypów. Podobnie w kładzie II wyznaczone zostały klastry grupujące się wokół haplotypów **H61**, **H48**, **H88**, **H86**.

Na podstawie otrzymanych drzew filogenetycznych uzyskano podobny obraz (Załączniki IV–IX). Topologie drzew skonstruowanych różnymi metodami wskazały na podział badanej populacji na dwie główne grupy. Haplotyp **H29** w drzewach wykonanych metodami ML (Ryciny 22 i 23) oraz N-J (Załączniki IV i V) miał pozycję zewnętrzną w stosunku do pozostałych haplotypów należących do kładu I. Natomiast w przypadku drzewa grupowanego metodą UPGMA (Załącznik VI i VII) zewnętrzną pozycję miał haplotyp **H105** najbardziej oddalony od haplotypu centralnego. W analizie wykonanej metodą MP (Załącznik VIII i IX) haplotypy zewnętrzne dla tego kładu

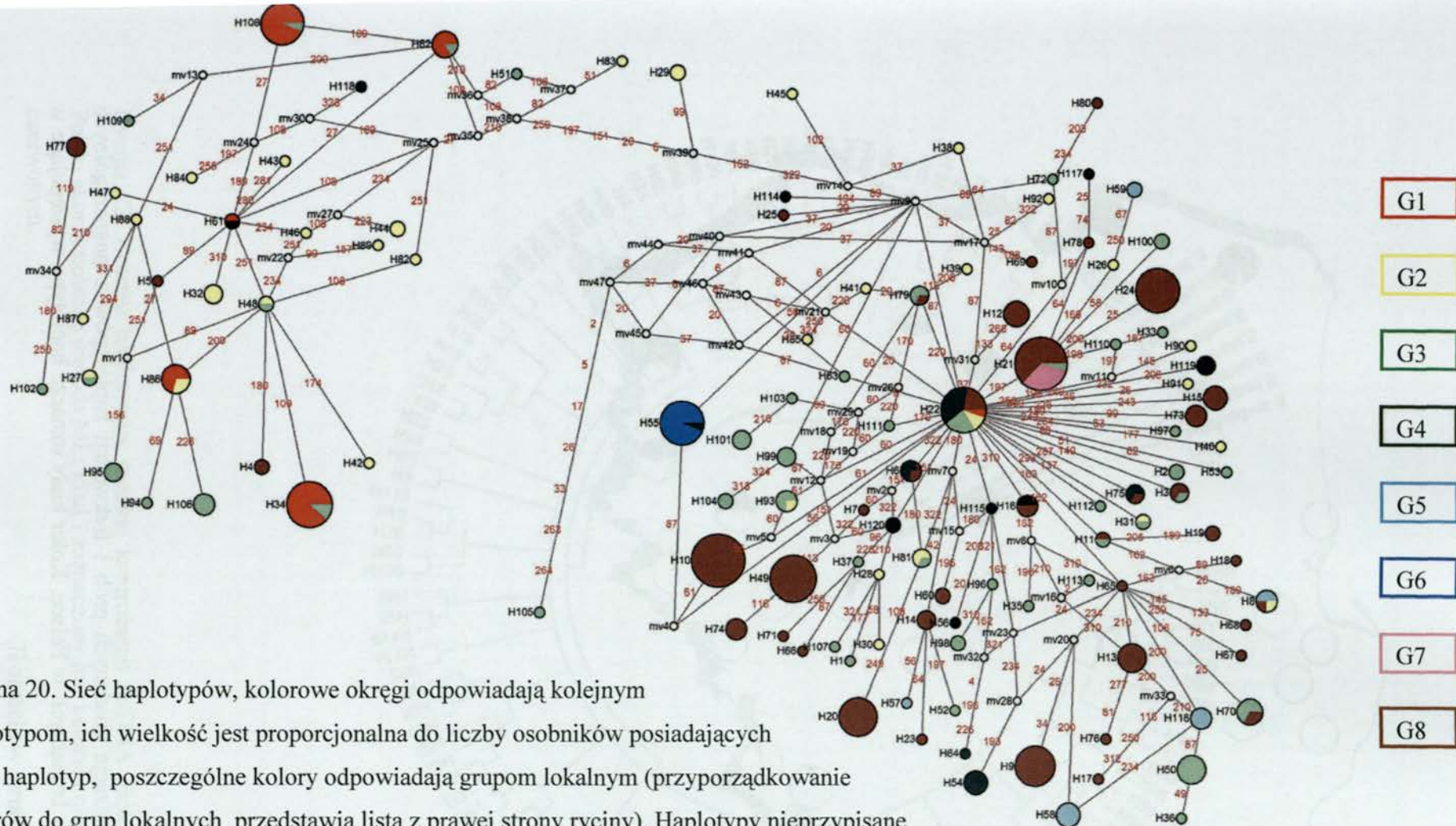
podobnie stanowiły haplotypy znajdujące się na peryferiach sieci: **H119**, **H85**, **H67**, **H17**. Podobnie dla kladu II haplotypy **H95** i **H5** miały pozycję zewnętrzną w dwóch z czterech analiz (N-J, MP). Jednak haplotyp **H61**, zajmujący pozycję centralną w sieci, w większości otrzymanych drzew zajął pozycję zewnętrzną dla znacznej liczby haplotypów w tym kładzie.



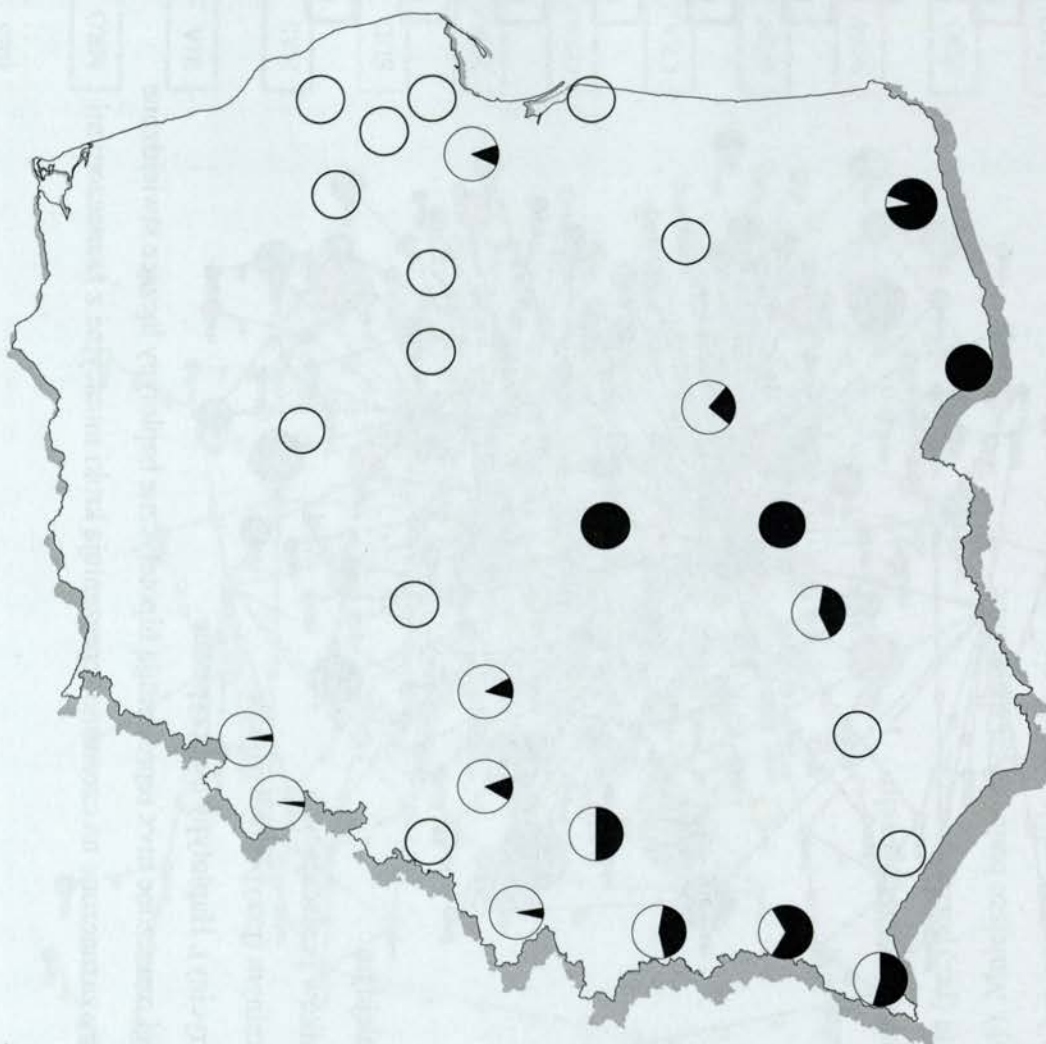
ANT	UNI
BES	LEZ
MRO	MLY
BIA	PUL
NAS	SLU
SUD	SZU
WWA	TAR
CHORZ	TOM
CZAR	TRZY
GON	KAS
SOW	GN
ZBO	DA
SZACH	RO
JEL	LO
	SAL

Rycina 19. Sieć haplotypów, kolorowe okręgi odpowiadają kolejnym haplotypom, ich wielkość jest proporcjonalna do liczby osobników posiadających dany haplotyp, poszczególne kolory odpowiadają lokalizacjom (przyporządkowanie kolorów do stanowisk przedstawia lista z prawej strony ryciny). Mniejsze białe okręgi oznaczone mvx reprezentują hipotetyczne haplotypy łączące stwierdzone haplotypy zgodnie z zasadami największej parsymonii.

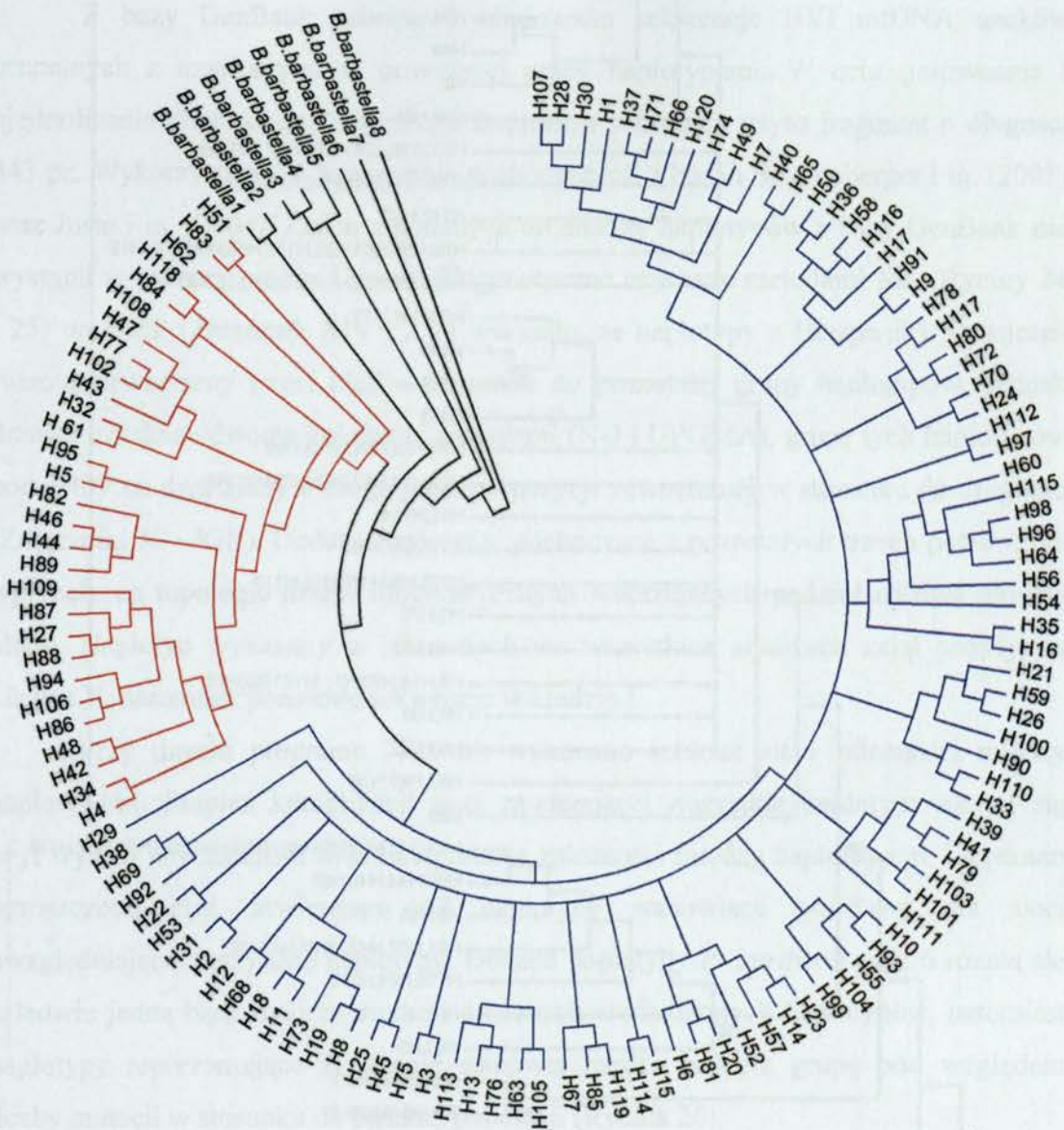
Numery zaznaczone na czerwono reprezentują kroki mutacyjne, z zaznaczonymi miejscami mutacji.



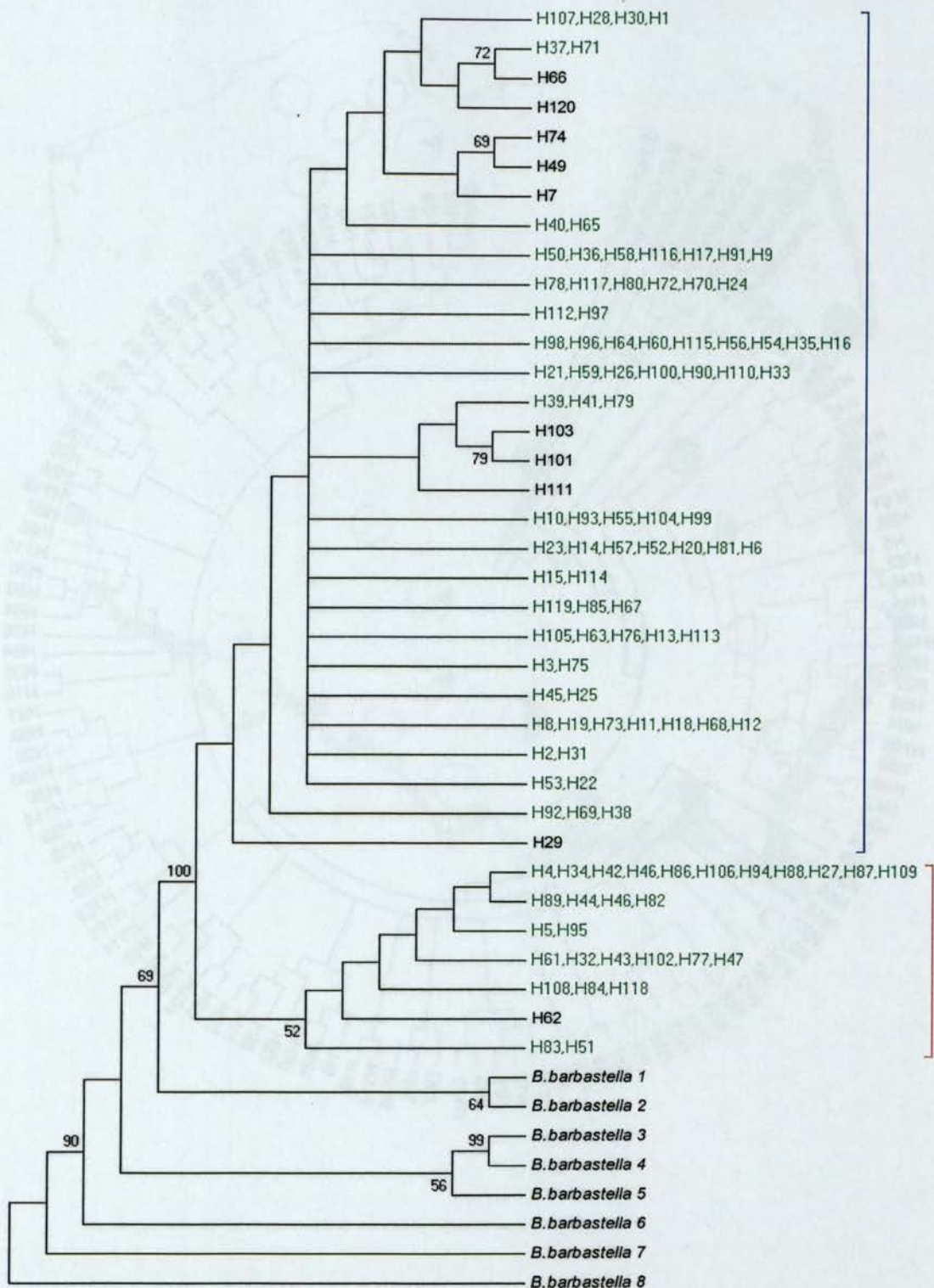
Rycina 20. Sieć haplotypów, kolorowe okręgi odpowiadają kolejnym haplotypom, ich wielkość jest proporcjonalna do liczby osobników posiadających dany haplotyp, poszczególne kolory odpowiadają grupom lokalnym (przyrządowanie kolorów do grup lokalnych przedstawia lista z prawej strony ryciny). Haplotypy nieprzypisane do grup zaznaczone są kolorem czarnym. Mniejsze białe okręgi oznaczone mvx reprezentują hipotetyczne haplotypy łączące stwierdzone haplotypy zgodnie z zasadami największej parsymonii. Numery zaznaczone na czerwono reprezentują kroki mutacyjne z zaznaczonymi miejscami mutacji.



Rycina 21. Lokalizacja zbadanych prób i frekwencji haplotypów z poszczególnych kładów u gacków brunatnych w Polsce. Kolor biały oznacza haplotypy występujące w kładzie I, kolor czarny w kładzie II.



Rycina 22. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Polski skonstruowane metodą ML; kład I zaznaczony jest kolorem niebieskim, a kład II czerwonym.

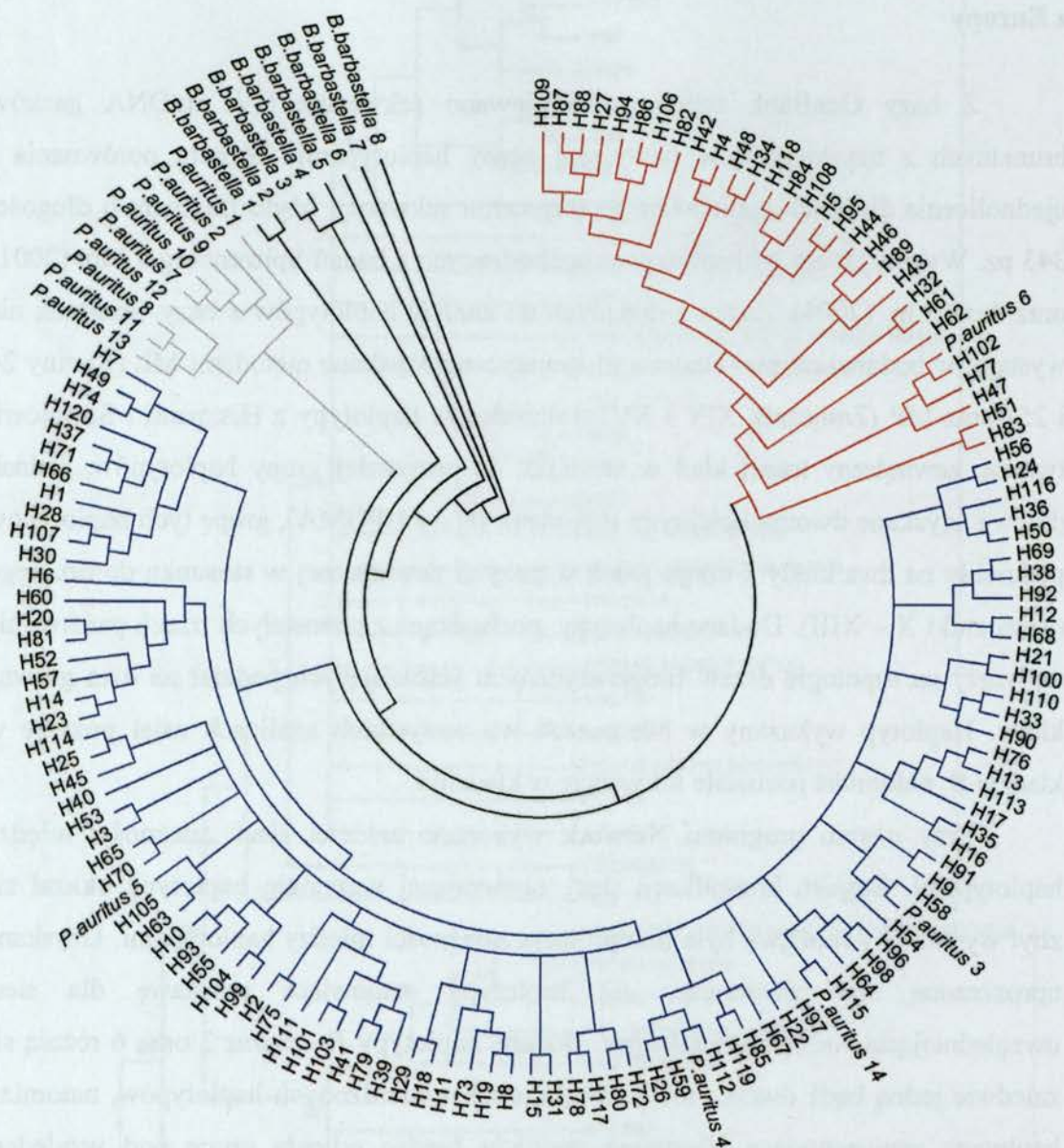


Rycina 23. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gaków brunatnych z Polski skonstruowane metodą ML; na drzewie zaznaczono wartości bootstrap co najmniej 50%. Kolorem zielonym zaznaczono haplotypy, wywodzące się z jednej gałęzi, które pogrupowano ze sobą w celu zwiększenia czytelności dendrogramu.

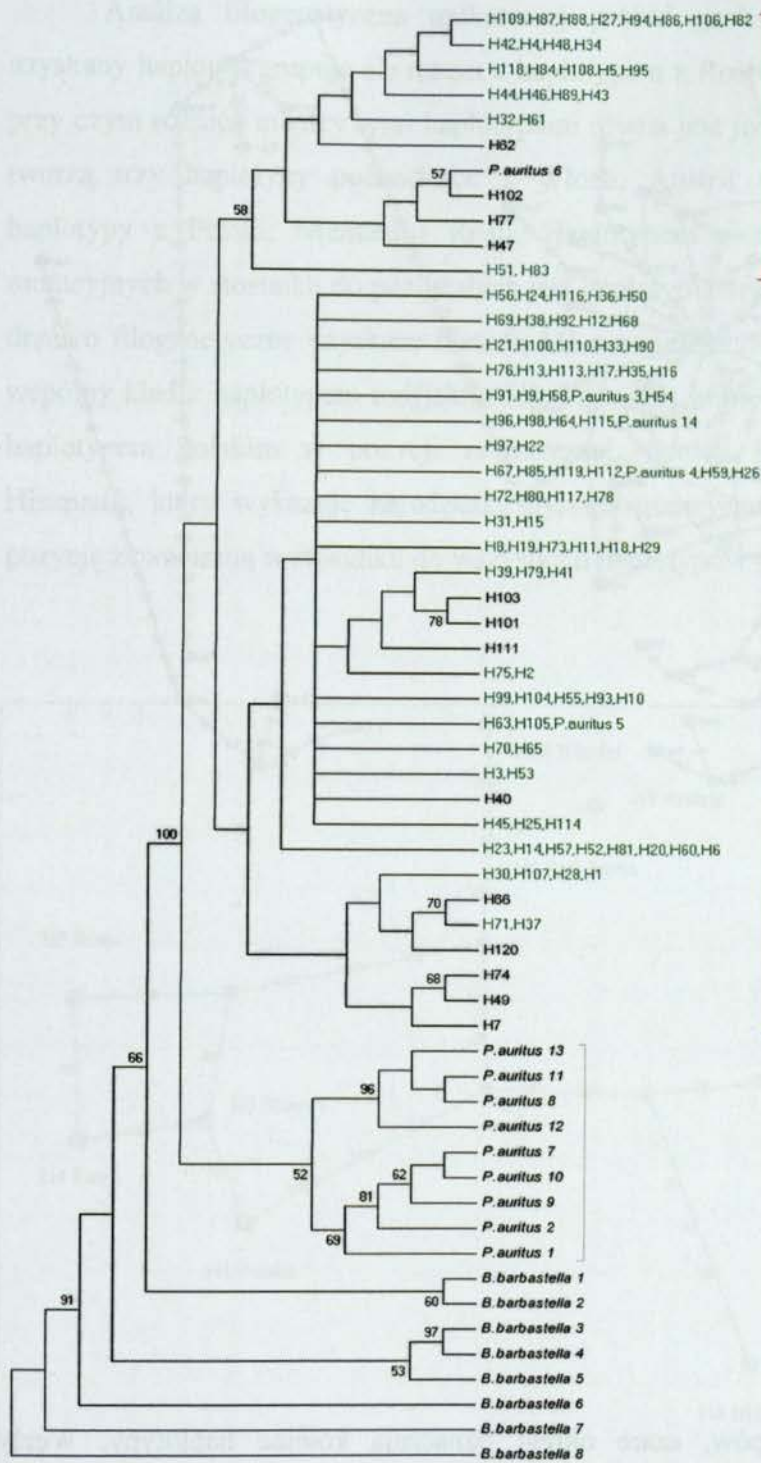
Analiza filogenetyczna między znanymi haplotypami mtDNA gacków brunatnych z Europy

Z bazy GenBank zebrano i uliniowano sekwencje HVI mtDNA gacków brunatnych z uzyskanymi w powyższej pracy haplotypami. W celu porównania i ujednoczenia długości analizowanego fragmentu sekwencji użyto fragment o długości 343 pz. Wykorzystano 14 haplotypów pochodzących z badań Spitzenberger i in. (2001) oraz Juste i in. (2004). Żaden z dodanych do analizy haplotypów z bazy GenBank nie wystąpił w badanej próbie. Drzewa filogenetyczne uzyskane metodami ML (Ryciny 24 i 25) oraz MP (Załącznik XIV i XV) wskazało, że haplotypy z Hiszpanii i Szwajcarii tworzą zewnętrzny trzeci kład w stosunku do pozostałej grupy haplotypów. Jednak drzewa uzyskane dwoma kolejnymi metodami (N-J i UPGMA), grupę tych haplotypów podzieliły na dwa klady z czego jeden w pozycji zewnętrznej w stosunku do drugiego (Załączniki X – XIII). Dodane haplotypy, pochodzące z pozostałych trzech państw, nie wpłynęły na topologie drzew filogenetycznych wskazujących podział na dwa główne klady. Haplotyp wykazany w Niemczech we wszystkich analizach zajął pozycję w kładzie II, natomiast pozostałe sekwencje w kładzie I.

Przy użyciu programu Network wykonano szkielet sieci zależności między haplotypami. Stopień komplikacji sieci zawierającej wszystkie haplotypy okazał się zbyt wysoki aby możliwa była interpretacja zależności między haplotypami. Uzyskano uproszczoną sieć zawierającą 62 haplotypy stanowiące podstawę dla sieci uwzględniającej wszystkie haplotypy. Dodane haplotypy *P. auritus* 3 oraz 6 różnią się zaledwie jedną bądź dwoma mutacją od innych stwierdzonych haplotypów, natomiast haplotypy reprezentujące Hiszpanię stanowią bardzo odległą grupę pod względem liczby mutacji w stosunku do badanej populacji (Rycina 26).

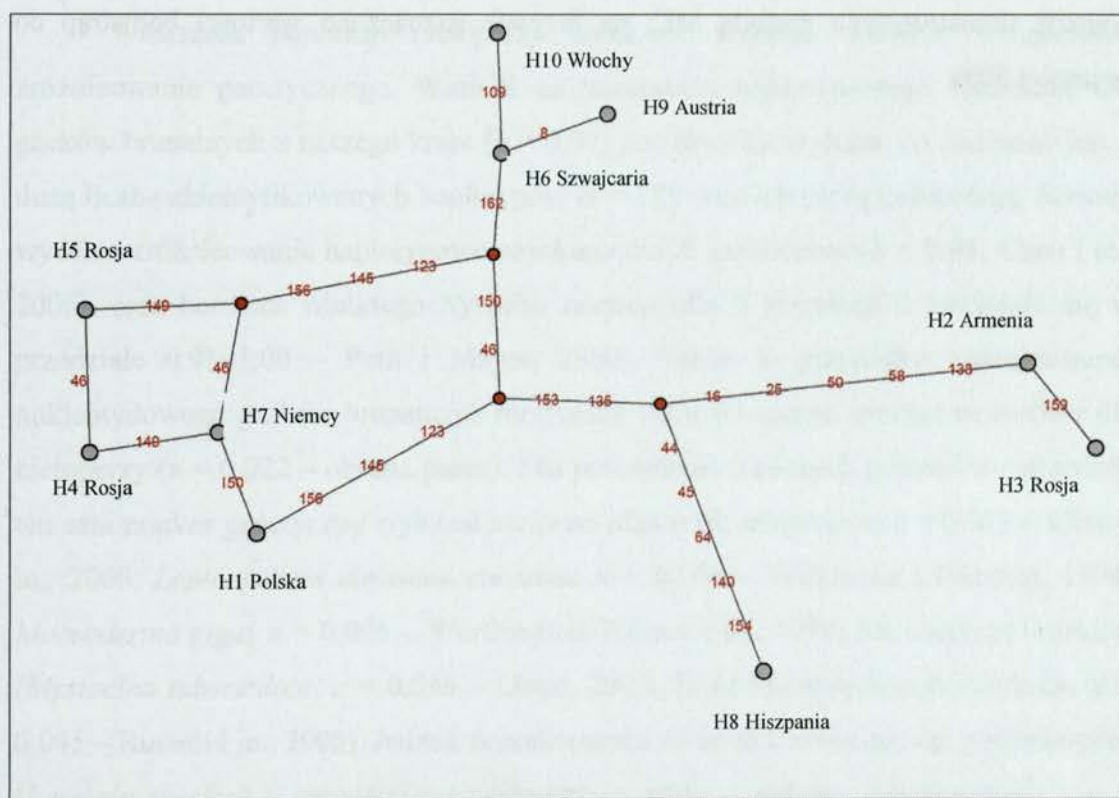


Rycina 24. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z obszaru Europy skonstruowane metodą ML; kład I zaznaczony jest kolorem niebieskim, kład II - czerwonym, kład reprezentujący osobniki pochodzące z Hiszpanii i Szwajcarii - szarym. Haplotypy dodane z bazy (GenBank) oznaczone są *P. auritus* x. (haplotypy pochodzące z Hiszpanii oznaczone są numerami 1–2, 7–10, 13, z Danii 3–5, ze Szwajcarii 11–12, z Niemiec 6, a z Austrii 14).

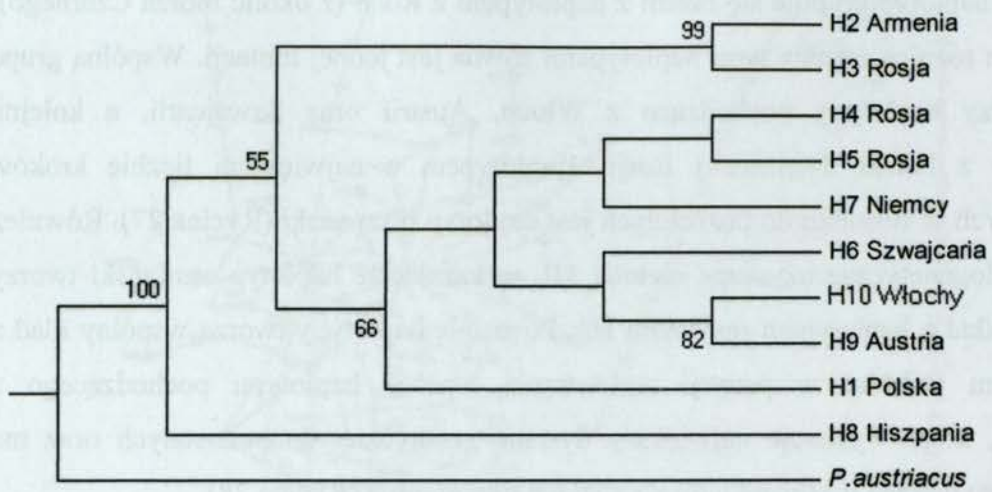


Rycina 25. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Europy skonstruowane metodą ML; na drzewie zaznaczono wartości bootstrap co najmniej 50%. Kolorem zielonym zaznaczono haplotypy, wywodzące się z jednej gałęzi, które pogrupowano ze sobą w celu zwiększenia czytelności dendrogramu.

Analiza filogenetyczna unikatowej próbki gacka z Armenii wskazała, że uzyskany haplotyp grupuje się razem z haplotypem z Rosji (z okolic morza Czarnego), przy czym różnica między tymi haplotypami równa jest jednej mutacji. Wspólną grupę tworzą trzy haplotypy pochodzące z Włoch, Austrii oraz Szwajcarii, a kolejną haplotypy z Polski, Niemiec i Rosji. Haplotypem o największej liczbie kroków mutacyjnych w stosunku do pozostałych jest haplotyp hiszpański (Rycina 27). Również drzewo filogenetyczne uzyskane metodą ML wskazało, że haplotyp ormiański tworzy wspólny kład z haplotypem rosyjskim H3. Pozostałe haplotypy tworzą wspólny kład z haplotypem polskim w pozycji zewnętrznej, oprócz haplotypu pochodzącego z Hiszpanii, który wykazuje największy dystans genetyczny do pozostałych oraz ma pozycję zewnętrzną w stosunku do wszystkich haplotypów (Rycina 28).



Rycina 27. Sieć haplotypów, szare okręgi oznaczają kolejne haplotypy. Mniejsze czerwone punkty reprezentują hipotetyczne haplotypy łączące występujące haplotypy zgodnie z zasadami największej parsymonii. Numery zaznaczone na czerwono reprezentują kroki mutacyjne z zaznaczonymi miejscami mutacji.



Rycina 28. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Eurazji skonstruowane metodą ML; na drzewie zaznaczono wartości bootstrap co najmniej 50%.

DYSKUSJA

Ocena poziomu zmienności rejonu kontrolnego mitochondrialnego DNA

W przypadku nietoperzy z Polski na 398 przeanalizowanych prób stwierdzono aż 120 haplotypów (30,2%). Jeszcze wyższy procent haplotypów w stosunku do liczby zbadanych nietoperzy ($106/203 = 52,2\%$) zaobserwowali Chen i in. (2006) analizując ten sam marker genetyczny u podkowca *Rhinolophus monoceros*. Warto zaznaczyć, że HVI jest jednym z dwóch markerów genetycznych o tak wysokiej zmienności, występującym w regionie kontrolnym mtDNA (Wilkinson i in., 1997). Drugim jest HVII. W badaniach nietoperzy również w przypadku HVII otrzymywano wysokie liczby haplotypów w stosunku do liczby badanych prób (Petit i Mayer, 2000; Ruedi i in., 2008).

Większość populacji nietoperzy wykazuje wysokie wartości wskaźników zróżnicowania genetycznego. Wartość zróżnicowania haplotypowego wyliczona dla gacków brunatnych z naszego kraju ($h = 0,97$) jest również wysoka, co związane jest z dużą liczbą zidentyfikowanych haplotypów $H = 120$ oraz ich niską frekwencją. Równie wysokie zróżnicowanie haplotypowe uzyskano dla *R. monoceros* ($h = 0,91$; Chen i in., 2006), oraz borowca wielkiego *Nyctalus noctula* (dla 5 populacji h zawierało się w przedziale 0,91–1,00 – Petit i Mayer, 2000). Także w przypadku zróżnicowania nukleotydowego gacków brunatnych otrzymane wartości można uważać za średnie dla nietoperzy ($\pi = 0,022$ – obecna praca). Dla porównania u różnych gatunków nietoperzy ten sam marker genetyczny wykazał zarówno niższe (*R. monoceros* $\pi = 0,013$ – Chen i in., 2006; *Leptonycteris curasoae curasoae* $\pi = 0,006$ – Wilkinson i Fleming, 1996; *Macroderma gigas* $\pi = 0,006$ – Worthington-Wilmer i in., 1999) jak i wyższe wartości (*Mystacina tuberculata*, $\pi = 0,036$ – Lloyd, 2003; *Tadarida brasiliensis mexicana* $\pi = 0,045$ – Russell i in., 2005). Jednak w porównaniu do innych zwierząt, np. podróżniczka (*Luscinia svecica*) – niewielkiego wędrownego ptaka z rodziny drozdowatych – $\pi = 0,0023$ (Zink i in., 2003), czy mundzaka czarnego (*Muntiacus crinifrons*) – ssaka parzystokopytnego z rodziny jeleniowatych – $\pi = 0,0086$ (Wu i in., 2006), otrzymany wynik jest wysoki. Wysokie zróżnicowanie nukleotydowe może wskazywać zarówno na długą historię ewolucji badanej populacji jak i na mieszanie się linii ewolucyjnych (Frankham, 1996; Grant i Bowen, 1998; Avise, 2000). Wpływ drugiego z tych czynników został potwierdzony na podstawie innych wyników. Zarówno otrzymane

sieci zależności haplotypów jak i drzewa filogenetyczne wskazały na podział polskiej populacji gacków brunatnych na dwa wyraźne klady. Z kolei wskaźniki zróżnicowania genetycznego w skali lokalnej były najwyższe dla grup lokalnych G2, G3 i G8, czyli dla centralnej i południowej części kraju. Na tej podstawie można oczekiwać wyższej koncentracji gacków brunatnych w tym rejonie. Wynik ten pośrednio wydaje się potwierdzać większa liczba osobników odłowionych w tych grupach lokalnych.

Wskaźniki h i π stwierdzone w przypadku osobników pochodzących z różnych typów stanowisk także były wysokie. Zróżnicowanie haplotypowe było najniższe dla nietoperzy z kolonii letnich ($h = 0,93$). Stanowiska te charakteryzowały się niższą niż w innych analizowanych miejscach średnią liczbą haplotypów oraz ich wysoką frekwencją. Wyniki te znajdują częściowe potwierdzenie w danych ekologicznych, z których jednoznacznie wynika duża filopatryczność samic (Entwistle i in., 2000). Wysokie frekwencje haplotypów w koloniach rozrodczych mogą też świadczyć o spokrewnieniu osobników, które należą do tych kolonii. Z kolei największe zróżnicowanie h i π stwierdzono dla nietoperzy pochodzących z miejsc rojenia. W miejscach tych nietoperze gromadzą się w bardzo licznych grupach. Miejsca te mogą też pełnić istotną rolę w rozrodzie gatunku i przepływie genów (np. Veith i in., 2004).

Całkowita liczba haplotypów jaka może występować na badanym obszarze została oszacowana na poziomie $Nh = 203$. Jest ona prawie dwa razy wyższa od uzyskanej ($H = 120$), co stanowi 59% ($120/203$): Zebrany materiał w dużej części reprezentuje różnorodność haplotypów występujących na badanym obszarze. Podobny wynik stwierdzono w przypadku oszacowania całkowitej liczby haplotypów na podstawie prób pochodzących z miejsc rojenia ($Nh = 199$). Jednak faktyczna liczba haplotypów stwierdzonych w miejscach rojenia jest znacznie niższa ($H = 72$). Zatem jedynie 36% ($72/199$) oszacowanej liczby haplotypów reprezentuje zebrana próba. Najniższą liczbę haplotypów odnotowano w koloniach rozrodczych ($H = 27$) ale jest ona bardzo zbliżona do oszacowanej ($Nh = 32$) bowiem stanowi aż 84% ($27/32$). Dla trzeciego typu stanowisk – żerowisk, stosunek liczby stwierdzonych i oszacowanych haplotypów wyniósł 34% ($49/143$), był zatem na poziomie wartości otrzymanej dla miejsc rojenia. Warto jednak zauważyć, że na całkowitą, teoretyczną liczbę haplotypów z danego obszaru główny wpływ ma zaobserwowana liczba haplotypów w odniesieniu do liczby analizowanych prób (Kohn i in., 1999). Znacznie mniejsze zróżnicowanie haplotypowe w koloniach letnich dla badanej liczby prób skutkuje niską wartością oszacowanej całkowitej liczby haplotypów, natomiast bardzo wysokie zróżnicowanie

haplotypowe zarówno w miejscach rojenia jak i na zerowiskach skutkuje znacznie wyższymi wartościami oszacowania liczby haplotypów w stosunku do liczby stwierdzonych haplotypów.

Genetyczna struktura populacji stwierdzona na podstawie analizy mtDNA

Pomimo zdolności do lotu gacki brunatne przemieszczają się na krótkich dystansach. Badania sezonowych przelotów wykazały, że średnia odległość ich przemieszczeń nie przekracza 30 km (Steffens i in., 2005). Wyniki analizy struktury genetycznej potwierdzają te obserwacje. Spośród 120 stwierdzonych haplotypów ponad 70% było unikatowych, charakterystycznych dla poszczególnych lokalizacji. Testy Mantela, przeprowadzone zarówno dla całej badanej populacji jak i trzech typów stanowisk, wykazały istotną statystycznie korelację pomiędzy dystansem geograficznym i genetycznym. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami (np. Burland i in., 1999). Obliczony indeks $F_{st} = 0,39$ był wysoki i istotny statystycznie, co świadczy o dużym stopniu zróżnicowania genetycznego (39%) pomiędzy osobnikami z poszczególnych lokalizacji. Podobny obraz uzyskano w badaniach (z wykorzystaniem HVII) niemieckiej populacji gacków brunatnych, gdzie stwierdzono dwa razy wyższy stopień zróżnicowania genetycznego między koloniami letnimi w porównaniu do miejsc rojenia (odpowiednio 60% i 31% – Veith i in., 2004). Wyniki te nie pokrywają się z danymi otrzymanymi na podstawie analiz markerów mikrosatelitarnych u gacków brunatnych, które sugerują niskie zróżnicowanie genetyczne między lokalnymi populacjami oraz intensywny przepływ genów (Burland i in., 1999; Veith i in., 2004; Furmankiewicz i Altringham, 2007). Niezgodność ta spowodowana jest dużą różnicą w poziomie filopatryczności samic i samców. Warto również pamiętać, że markery jądrowe i mitochondrialne są dziedziczone w odmienny sposób a ich analiza dostarcza kompatybilnych informacji (Karl i in., 1992; Avise, 2004). Kiedy intensywny przepływ genów jest wynikiem dyspersji samców, podczas gdy samice są silnie filopatryczne, skutkuje to niskim poziomem przepływu genów mitochondrialnych pomiędzy sąsiednimi populacjami – wówczas stopień zróżnicowania przestrzennego haplotypów mtDNA jest wyższy w porównaniu z markerami jądrowymi. W przypadku wyższej dyspersyjności samic niż samców, należy oczekiwać sytuacji odwrotnej (Segelbacher i in., 2008). Różnice we wzorcach zmienności genetycznej, w zależności od użytych

markerów genetycznych, stwierdzono między innymi u nocków Bechsteina (Kerth i in., 2002) i nocków dużych (Ruedi i Castella, 2003).

Na podstawie analizy zmienności molekularnej AMOVA w niniejszej pracy przyjęto podział na osiem grup, pomiędzy którymi zmienność genetyczna wynosiła około 30% ($\Phi_{ct} = 0,303$). Nieznacznie mniejsze wartości tej statystyki ($\Phi_{ct} = 0,240$ – $0,303$) uzyskano w przypadku testowania 16 różnych podziałów na inne grupy geograficzne. Wskazuje to na brak jednoznacznej struktury genetycznej przy wysokim stopniu zróżnicowania. Ogólny indeks F_{st} oraz wartość statystyk Φ_{st} potwierdzają wysoki poziom zróżnicowania genetycznego pomiędzy osobnikami z poszczególnych lokalizacji jak i grupami stanowisk. Prawdopodobnie niejednoznaczny wynik analizy AMOVA związany jest z wysoką liczbą unikatowych haplotypów. W badaniach gacków brunatnych przeprowadzonych na terenie Niemiec również uzyskano szereg haplotypów unikatowych (HVII) charakterystycznych dla poszczególnych kolonii rozrodczych (Veith i in., 2004). Podobnie Kerth i in. (2000), analizując HVI u nocków Bechsteina, stwierdzili haplotypy unikatowe dla trzech z siedmiu analizowanych kolonii letnich. Natomiast w pozostałych czterech koloniach wykazali bardzo mały procent haplotypów wspólnych (zróżnicowane genetyczne wynosiło 68% – Kerth i in., 2000). Wysoka liczba haplotypów unikatowych związana jest z wysokim stopniem zróżnicowania genetycznego między osobnikami z poszczególnych stanowisk. Jednak, jak ma to miejsce w przypadku polskiej populacji gacków brunatnych, brak jest dominującego wzorca grupowania lokalizacji w jednostki na wyższym poziomie organizacji. Wnioskowanie o strukturze genetycznej populacji, na podstawie wysoko polimorficznych markerów genetycznych, może być problematyczne (Hedrick, 1999), bowiem wysoka liczba haplotypów (zwłaszcza unikatowych) powoduje zmianę wartości odchylenie wariancji pomiędzy populacjami (Veith i in., 2004). Może być to związane z ograniczeniami obliczeniowymi używanych algorytmów oraz niedoszacowaniem obliczonych indeksów (Hartl i Clark, 2007). Pomimo, że poziom dystansu genetycznego między osobnikami z różnych stanowisk nie pozwala na określenie jednoznacznej struktury genetycznej badanej populacji, to zarówno dendrogramy dystansów genetycznych jak i wyniki testów Mantela wskazują, że osobniki o bardziej podobnym haplocyfie występują w bliższej odległości. Zjawisko izolacji przez dystans stwierdzono również w szkockiej populacji gacków brunatnych, przy czym brak geograficznych barier dla przepływu genów sugeruje wpływ innych czynników niż geograficzne – w tym przypadku ekologicznych – na to zjawisko

(Burland i in., 1999). Badania z wykorzystaniem obrączkowania również potwierdzają osiadły charakter tego gatunku oraz wskazują na bliską lokalizację miejsc zimowania i kolonii letnich (Strelkov, 1969; Entwistle i in., 2000). Również u *R. monoceros* wykazano korelację między dystansem genetycznym a geograficznym, która nie była związana z barierami geograficznymi (Chen i in., 2006).

Dendrogramy wyznaczone między grupami lokalnymi metodami N-J i ME wskazały na strukturę, w której regiony wschodni i południowo-wschodni (odpowiednio grupa lokalna G1 i G2) tworzyły jedną dużą grupę. Kolejną dużą grupę stwierdzono dla regionów północnego oraz południowo-zachodniego (odpowiednio grupy lokalne G4, G6, G7 i G8), zaś pozostałe dwie grupy lokalne G3 i G5 stanowiły odrębne jednostki. Jedynie dendrogram zbudowany metodą UPGMA ujawnił serię kolejno oddzielających się gałęzi drzewa z grupą G1 w pozycji najbardziej zewnętrznej. Taki schemat dendrogramu mógł być wynikiem małej istotności poszukiwanej struktury tego rzędu. Podział osobników wskazany przez dendrogramy wykonane metodami N-J i ME może sugerować drogi postglacjalnej kolonizacji w kierunkach wschodnim i zachodnim, co w przypadku gacków brunatnych sugerowali Juste i in., (2004), a dla wielu innych zwierząt Schmitt (2007).

Ocena poziomu migracji między grupami lokalnymi

Ze względu na wysoką liczbę haplotypów (w tym znaczny procent haplotypów unikatowych) oraz wysoką liczbę stanowisk, nie można było oszacować liczby migrantów pomiędzy poszczególnymi lokalizacjami. Niemniej jednak udało się wyliczyć liczbę migrantów pomiędzy grupami, które wyznaczono na podstawie analizy AMOVA, przy czym grupy lokalne z obszaru północnego (ze względu na ich niską liczebność) potraktowano jako jedną. Wyniki tej analizy wskazały na bardzo niski poziom migracji, tj. średnio < 1 migrująca samica pomiędzy grupami G1 i GP oraz G1 i G8. Obie grupy zlokalizowane są w północnej części Polski, skąd znaczna ilość zebranych prób pochodziła z kolonii letnich (Tabela 1). Poziom zróżnicowania haplotypowego obliczony dla kolonii rozrodczych był najniższy ($h = 0,930 \pm 0,006$) w porównaniu do pozostałych typów stanowisk, dla 173 osobników odłowionych z kolonii letnich stwierdzono jedynie 27 haplotypów. Uzyskany wynik liczby migrantów, w połączeniu z bardzo niskim zróżnicowaniem genetycznym w obrębie poszczególnych kolonii (np. w kolonii UNI wystąpił tylko jeden haplotyp, Tabela 5) wskazuje na

niezwykle silną filopatrię samic w stosunku do letnich kryjówek. Silna filopatria samic była również wykazywana u innych gatunków nietoperzy (nocek Bechsteina – Kerth i in., 2002; nocek duży – Petri i in., 1997; Castella i in., 2001). Nieznacznie wyższe wartości oszacowano między grupami G3, G8 i GP (od 2 do 3 migrantów), związane jest to z wyższymi wskaźnikami zróżnicowania genetycznego obliczonego dla tych grup lokalnych. Oszacowane liczby migrantów pomiędzy grupami lokalnymi są niskie, co zgodne jest z wysoką filopatrycznością samic. Wyniki te pokrywają się z obserwacjami ekologicznymi gacków brunatnych, z których wynika, że przeloty między koloniami są rzadkie i ograniczone do krótkich dystansów (np. Strelkov, 1969; Entwistle i in., 2000). Brak wyraźnych barier geograficznych między grupami lokalnymi, sugeruje, że tak niska liczba samic migrantów wiąże się głównie z ich silną filopatrią. Dodatkowym czynnikiem zapewne jest też specyficzna morfologia skrzydeł, która nie sprzyja lotom na długich dystansach (Altringham, 1996).

Nieco inną sytuację zaobserwowano w przypadku grup lokalnych G2 i G3, gdzie oszacowana liczba migrantów była zaskakująco wysoka (15 migrujących samic na pokolenie). Na wynik ten mogło wpłynąć przyporządkowanie lokalizacji MRO do grupy lokalnej G3, pomimo, że stanowisko to położone jest bliżej pozostałych stanowisk w grupie lokalnej G2. W związku z zależnością dystansu genetycznego od dystansu geograficznego, przemieszczanie się osobników pomiędzy bliżej położonymi lokalizacjami wydaje się bardziej prawdopodobne niż w przypadku stanowisk, które są bardziej od siebie oddalone. Częściowo potwierdza to występowanie haplotypu H22 w lokalizacjach MRO oraz ZBO. Drugim czynnikiem może być wpływ zróżnicowania genetycznego zarówno w grupie G2 jak i G3 (wysokie zróżnicowanie haplotypowe). Zwiększa to prawdopodobieństwo wylosowania przez program MDIV takich samych bądź podobnych haplotypów z obu grup lokalnych. Wydaje się, że wpływ obu wymienionych czynników może tłumaczyć uzyskany i zaskakujący wynik tak wysokiej liczby migrantów pomiędzy tymi grupami lokalnymi.

Relacje filogenetyczne między haplotypami mtDNA gacków brunatnych

Relacje filogenetyczne między haplotypami gacków brunatnych z Polski, przedstawione w postaci sieci haplotypów, wskazały podział na dwa główne klady (Ryciny 23 i 24). Kład I charakteryzuje się topologią gwiazdy, z haplotypem centralnym H22. Haplotyp ten występuje w największej liczbie lokalizacji (siedmiu) i

ma jedną z najwyższych frekwencji, zatem hipotetyczna sekwencja w korzeniu kladu byłaby najbardziej podobna do haplotypu H22. Druga część sieci haplotypów reprezentuje kład II, który składa się ze znacznie mniejszej liczby haplotypów. Jednak analiza z wykorzystaniem algorytmu *star contraction* również wskazała na istnienie klastru o topologii gwiazdy w tej części sieci, a najbardziej prawdopodobnym haplotypem centralnym jest H61.

Na drzewach filogenetycznych wszystkich znanych haplotypów gacków brunatnych stwierdzono, że część osobników pochodzących z Hiszpanii tworzy odrębny kład. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Juste i in., 2004), w których kład ten tworzyły osobniki należące do podgatunku *Plecotus auritus begoniae* (De Paz, 1994). Uzyskane przez Juste i in. (2004) wielkości dystansu genetycznego (7% dla cytochromu *b*) między tym podgatunkiem a podgatunkiem nominatywnym *P. a. auritus* oraz monofiletyczność kladu potwierdziły występowanie przedstawicieli tego endemicznego taksonu (który być może jest nawet odrębnym gatunkiem) w Hiszpanii. Kolejny kład tworzyły osobniki pochodzące z Hiszpanii oraz Szwajcarii, co może wskazywać, że więcej niż jedna linia ewolucyjna przetrwała w refugium iberyjskim (Juste i in. 2004). Pozostałe haplotypy stwierdzone przez Juste i in. (2004), a pochodzące z Danii, Niemiec i Austrii, zgrupowały się w obrębie dwóch innych kładów wyznaczonych na podstawie analiz filogenetycznych. Nie wpłynęły one na topologię wygenerowanych drzew filogenetycznych. Haplotyp pochodzący z Niemiec zajął pozycje w kładzie II, natomiast pozostałe haplotypy w kładzie I. Badania na obszarze Europy wskazują na istnienie dwóch linii ewolucyjnych, których rozmieszczenie sugeruje pochodzenie ze wschodniej i zachodniej części Europy oraz późniejsze kontakty przedstawicieli obu linii ewolucyjnych w centralnej Europie (Spitzenberger i in., 2001; Kiefer i in., 2002; Juste i in., 2004). Nieco bardziej skomplikowany wzorzec filogeograficzny jest obserwowany u nocków dużych (Bogdanowicz i in. 2009; Ruedi i Castella, 2003).

Filogeografia na podstawie mitochondrialnego markera molekularnego

Jednym z głównych procesów historycznych, który wpływa na rozmieszczenie różnicowania genetycznego organizmów jest izolacja w różnych refugiach lodowcowych (Taberlet i in., 1998; Hewitt, 2000). W okresach interglacjalnych, gdy lodowiec ustępuje, gatunki opuszczają refugia i kolonizują dostępne środowiska

przesuwając się na północ. Na podstawie dotychczasowych badań wyróżnia się trzy główne refugia w Europie: iberyjskie, apenińskie oraz bałkańskie (Cooper i in., 1995; Hewitt, 2000). Niemniej jednak kolejne badania wskazują również na rolę refugium karpackiego w procesach rekolonizacji Europy (Hewitt, 2004; Kotlik i in., 2006; Sommer i Nadachowski, 2006) jak również półwyspu krymskiego (Bogdanowicz i in., 2009). Porównanie poziomu zmienności genetycznej populacji z obszaru refugium oraz obszarów zajmowanych wcześniej przez lodowiec pozwala na odtworzenie szlaków kolonizacyjnych (Freeland, 2005). Ze względu na różnice w ekologii poszczególnych gatunków, wzorce takich szlaków migracji różnią się między sobą. W przypadku owada z grupy prostoskrzydłych – konika wąsacza (*Chorthippus parallelus*) – Pireneje i Alpy były barierą w rozprzestrzenianiu się tego gatunku w kierunku północnym, natomiast dla jeża zachodniego (*Erinaceus europaeus*) te masywy górskie nie stanowiły istotnej przeszkody w jego ekspansji na północ (Hewitt, 1999).

Wyniki uzyskane na podstawie sieci haplotypów, drzew filogenetycznych oraz rozkładu różnic nukleotydowych potwierdziły podział polskiej populacji gacków brunatnych na dwa kłady. Obliczony dystans genetyczny między uzyskanymi kładami wyniósł 3,8%. Podobny wynik (2,6%) otrzymano w przypadku dwóch kładównocków rudych (*Myotis daubentonii*) kolonizujących Szkocję z odrębnych refugium. Uzyskany poziom różnicowania genetycznego jest znacznie niższy niż dystans genetyczny pomiędzy dwoma siostrzanymi gatunkaminocków *M. daubentonii* i *M. petax* (13,6%) (Ngamprasertwong i in., 2008). Również w przypadku gacków: brunatnych i szarych obliczony dystans genetyczny w programie MEGA był znacznie wyższy (13,2% – obecna praca) od dystansu obliczonego między uzyskanymi kładami. Taki podział, na podstawie mtDNA, świadczący o wtórnym kontakcie linii ewolucyjnych odseparowanych od siebie w czasie zlodowaceń w refugium lodowcowych jest obserwowany również u innych gatunków nietoperzy (np. *Rhinolophus euryale* – Bilgin i in., 2008; *Myotis myotis* – Bogdanowicz i in., 2009).

Analiza rozkładu różnic nukleotydowych wskazała, że oba wyróżnione kłady przeszły przez etap ekspansji, przy czym model ekspansji geograficznej jest bardziej prawdopodobny w kładzie I. Natomiast kład II przeszedł przez etap ekspansji zarówno demograficznej jak i geograficznej. Cztery testy neutralności jednoznacznie potwierdziły ten wynik zarówno gdy przeprowadzone były dla całej populacji jak i dla kładu I. W przypadku kładu II dwa (D_T oraz D^*) z czterech zastosowanych testów neutralności dały wynik nieistotny statystycznie. Warto jednak zaznaczyć, że te

„nieistotne” testy były testami o mniejszej mocy, a w takim przypadku istotne znaczenie w wykrywalności przez nie zjawisk demograficznych może mieć liczebność próby (w kładzie II $n = 86$, a w kładzie I $n = 312$; patrz także Ramos-Onsins i Rozas, 2002). Zjawiska ekspansji zarówno demograficznej jak i geograficznej następujące po okresach zlodowacenia są charakterystyczne dla północnej części Europy, u wielu gatunków można zaobserwować taki wzorzec (Schmitt, 2007; Bilgin i in., 2008; Hansson i in., 2008; Stamatis i in., 2009).

Wartości współczynnika τ dla kładów I (4,746) i II (3,797) wskazują, że czas od ekspansji jaki upłynął jest dłuższy w przypadku pierwszego z tych kładów. Przy przyjętym tempie mutacji HVI na poziomie 20% na milion lat oraz przemianie pokoleń co dwa lata, możliwe było oszacowanie czasu jaki upłynął od momentu ekspansji. Jednak wyliczony przedział ufności dla kładu II jest bardzo szeroki (55 000–147 000 lat) i pokrywa się z wynikiem uzyskanym dla kładu I (138 000 lat). Otrzymane wartości wskazują, że ekspansja na terenie Polski mogła mieć miejsce podczas interglacjału emskiego (132 000–115 000 lat temu). Z kolei wysokie zróżnicowanie genetyczne stwierdzone na południu kraju może sugerować, że populacja gacków brunatnych przetrwała w tej części Polski okres zlodowacenia północnopolskiego. W przypadku niektórych gatunków nietoperzy bardziej prawdopodobna wydaje się być kolonizacja centralnej Europy po ostatnim maksimum glacialnym (18 000 lat temu) (np. nocek Bechsteina – Kerth i in., 2008; borowiec wielki – Petit i in., 1999), podobnie jak i wielu innych gatunków zwierząt (Schmitt, 2007).

Juste i in. (2004), analizując HVI, wyodrębnili trzy główne klady gacków brunatnych w Europie, przy czym pierwszy z nich stanowiły osobniki endemicznego podgatunku *P. a. begognae*. Występowanie tego kładu jest ograniczone do centralnej Hiszpanii. Natomiast dwa pozostałe klady prawdopodobnie wyodrębniły się w środkowym plejstocenie (800 000 lat temu), po czym nastąpiła postglacialna rekolonizacja Europy z refugium iberyjskiego oraz bałkańskiego. Wskazuje na to między innymi rozmieszczenie przedstawicieli obu kładów na terenie Europy. I tak kład w zachodniej części Europy tworzą osobniki pochodzące z Hiszpanii oraz Szwajcarii, a kład o charakterze wschodnim – osobniki pochodzące ze Szwajcarii, Niemiec, Danii oraz Austrii. W poniższej pracy również wykazano istnienie dwóch odrębnych kładów na terenie Polski. Niemniej jednak klady te nie są odpowiednikiem dwóch kładów opisanych przez Juste i in. (2004). Stwierdzone przez Juste i in. (2004) haplotypy, które tworzyły kład wschodni, po włączeniu do dendrogramu haplotypów gacków brunatnych

z Polski, grupują się w obrębie obu stwierdzonych w niniejszej pracy kładów. Pozycja kładu opisanego jako zachodni pozostaje bez zmian. Być może kolonizacja postglacjalna obszaru Polski nastąpiła dwukrotnie z refugium bałkańskiego, w którym mogła przetrwać więcej niż jedna linia ewolucyjna tego gatunku. Podobne scenariusze postglacjalnej kolonizacji centralnej Europy znane są dla konika wąsacza (Cooper i in., 1995) czy myszy leśnej (Michaux i in., 1996). Inną możliwością jest kolonizacja badanego obszaru z niezidentyfikowanego do tej pory refugium na terenie Europy (patrz np. Bogdanowicz i in. 2009). Jednak zweryfikowanie tych hipotez wymaga kolejnych badań oraz zwiększonej liczby prób z obszaru Europy.

Implikacje dla ochrony gatunku

Wyróżnia się dwa rodzaje jednostek ochrony gatunku: jednostki zarządzania (MU – *management units*) oraz jednostki ważne ewolucyjnie (ESU – *evolutionary significant units*). Jednostka zarządzania to populacja, która wymienia niewielu migrantów z innymi populacjami i w efekcie staje się genetycznie odrębną (Avice, 2000). Z kolei jednostka ważna ewolucyjnie to populacja lub grupa populacji, które były odseparowane od siebie w długiej skali ewolucyjnej i ich ewolucja przebiegała niezależnie. Zazwyczaj ESU charakteryzuje się na podstawie wzajemnej monofiletyczności mtDNA (Moritz, 1994). Znajomość MU oraz ESU jest bardzo istotna dla długoterminowej ochrony gatunków i zachowania zmienności genetycznej.

Relacje filogenetyczne między haplotypami mtDNA wskazują, że gacki brunatne z Polski tworzą dwie odrębne grupy, które są wzajemnie monofiletyczne pod względem haplotypów mtDNA, lecz nie ma pomiędzy nimi geograficznej izolacji. Są to zatem jednostki ważne ewolucyjnie, wymagające indywidualnej ochrony.

Należy również zwrócić uwagę na silną filopatrię samic i wysokie zróżnicowanie genetyczne pomiędzy koloniami rozrodczymi gacków brunatnych. Te powinny być rozpatrywane jako osobne jednostki zarządzania. Są one nie tylko głównym komponentem populacji lokalnych ale też miejscami koncentracji samic, co wiąże się z wysoką wrażliwością na lokalne negatywne czynniki; w przypadku znacznej redukcji osobników w kolonii rozrodczej nie można oczekiwać odbudowy takiej kolonii wskutek migracji samic z kolonii sąsiednich. Duże znaczenie ma również wysoka selektywność gacków brunatnych w wyborze letniej kryjówki oraz wykorzystywanie tej samej kolonii w kolejnych latach (Entwistle i in., 1997). Istotny wpływ może mieć w tym przypadku

edukacja społeczeństwa, ponieważ nietoperze często zakładają kolonie rozrodcze na strychach prywatnych budynków położonych w pobliżu terenów leśnych. Nie bez znaczenia jest też ochrona miejsc rojenia czy hibernacji nietoperzy ze względu na pełnione funkcje, zwłaszcza te związane z rozmnażaniem i przepływem genów (Parsons i Jones, 2003; Furmankiewicz, 2004; Rivers i in., 2006).

„Polska” populacja gacków brunatnych, charakteryzująca się współwystępowaniem dwóch odrębnych linii ewolucyjnych, wykazuje bardzo wysoki poziom zróżnicowania genetycznego. Natomiast w poszczególnych koloniach rozrodczych zróżnicowanie genetyczne jest niskie, a jednostki te mają kluczowe znaczenie w ewolucji tego gatunku. Dlatego dla ochrony zarówno genetycznego zróżnicowania jak i procesów ewolucyjnych ważne jest aby działania ochroniarskie koncentrowały się na obu poziomach przestrzennej organizacji.

WNIOSKI

1. W powyższej pracy na podstawie analizy HVI mtDNA stwierdzono wysokie zróżnicowanie haplotypowe gacków brunatnych z obszaru Polski ($h = 0,97$).
2. Analiza genetycznej struktury populacji wykazała istnienie istotnych zależności między dystansami genetycznym i geograficznym ($r = 0,46$, $P < 0,001$), oraz wysokie zróżnicowanie genetyczne w badanej populacji ($F_{ST} = 0,39$).
3. Analiza zmienności molekularnej (AMOVA), pomimo, że nie wykazała jednoznacznego grupowania stanowisk w wyższe jednostki, to ujawniła znaczne zróżnicowanie genetyczne między grupami lokalizacji w różnych regionach geograficznych kraju.
4. Analiza częstości migracji pokazała bardzo małą liczbę migrujących samic i potwierdziła ich wysoką filopatryczność. Uzyskany wynik, w połączeniu z wysokim zróżnicowaniem genetycznym, może wskazywać na bardzo ograniczony przepływ genów w badanej populacji.
5. Zarówno przeprowadzone testy neutralności jak i analiza rozkładu różnic nukleotydowych ujawniły, że badana populacja przeszła przez zjawisko ekspansji.
6. Analiza relacji filogenetycznych stwierdzonych haplotypów wskazała na podział na dwa główne klady.
7. Szczegółowa analiza demograficzna z uwzględnieniem podziału na dwa główne klady, wskazała, że oba niezależnie przeszły przez zjawisko ekspansji, przy czym ekspansja w kladzie II nastąpiła później w stosunku do kladu I.
8. Łączna analiza uzyskanych haplotypów z haplotypami opisanymi we wcześniejszych pracach nie zmieniła topologii drzew filogenetycznych. W

kladzie I wystąpiły haplotypy stwierdzone w Danii i Austrii, a w kladzie II haplotyp zaobserwowany na terenie Niemiec.

9. W oparciu o uzyskane wyniki dla mtDNA stwierdzono występowanie dwóch jednostek ważnych ewolucyjnie.

LITERATURA

Altringham J. D. (1996) Bats biology and behaviour. Oxford University Press, Oxford, England.

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

Avice J. C. (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Avice J. C. (2004) Molecular markers, natural history, and evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Ayala F. J. (1982) The genetic structure of species. Perspectives on evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 37–48.

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.

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.

Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Wheeler D. L. (2008) GenBank. *Nucleic Acids Research* **36** (Database issue): D25–30.

Bilgin R., Furman A., Çoraman E., Karataş A. (2008) Phylogeography of the Mediterranean horseshoe bat, *Rhinolophus euryale* (Chiroptera: Rhinolophidae), in southeastern Europe and Anatolia. *Acta Chiropterologica* **10**: 41–49.

Birky C. W. Jr. (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics* **35**: 125–148.

Bogdanowicz W., Van Den Bussche R. A., Gajewska M., Postawa T., Harutyunyan M. (2009) Ancient and contemporary DNA sheds light on the history of mouse-eared bats in Europe and the Caucasus. *Acta Chiropterologica* **11**: 289–305.

Bohonak A. J. (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly Review of Biology* **74**: 21–45.

Brown W. M., George M. Jr, Wilson A. C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 1967–1971.

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 the Royal Society, Series B* **266**: 975–980.

Campbell P., Schneider C. J., Adnan A. M., Zubaid A., Kunz T. H. (2006) Comparative population structure of *Cynopterus* fruit bats in peninsular Malaysia and southern Thailand. *Molecular Ecology* **15**: 29–47.

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.

Chen S. F., Rossiter S. J., Faulkes C. G., Jones G. (2006) Population genetic structure and demographic history of the endemic formosan lesser horseshoe bat (*Rhinolophus monoceros*). *Molecular Ecology* **15**:1643–1656.

Cooper S. J., Ibrahim K. M., Hewitt G. M. (1995) Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* **4**: 49–60.

de Paz O. (1994) Systematic position of *Plecotus* (Geoffroy, 1818) from the Iberian Peninsula (Mammalia: Chiroptera). *Mammalia* **58**: 423–432.

Entwistle A. C., Racey P. A., Speakman J. R. (1997) Roost selection by the brown long-eared bat *Plecotus auritus*. *Journal of Applied Ecology* **34**: 399–408.

Entwistle A. C., Racey P. A., Speakman J. R. (2000) Social and population structure of a gleaning bat, *Plecotus auritus*. *Journal of Zoology (London)* **252**: 11–17.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.

Farris J. S. (1970) Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology* **19**: 83–92.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.

Felsenstein J. (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Fenton M. B. (1969) Summer activity of *Myotis lucifugus* (Chiroptera: Vespertilionidae) at hibernacula in Ontario and Quebec. *Canadian Journal of Zoology* **47**: 597–602.

Forster P., Torroni A., Renfrew C., Röhl A. (2001) Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1864–1881.

Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* **10**: 1500–1508.

Freeland J. R. (2005) *Molecular ecology*. John Wiley & Sons Ltd., Sussex.

Fu Y. X., LI W. H. (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**: 693–709.

Fu Y. X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915–925.

Furmankiewicz J. (2004) Mating behaviour of brown long-eared bat *Plecotus auritus* (Linnaeus, 1758). PhD Thesis, University of Wrocław, Poland. [in Polish]

Furmankiewicz J., Altringham J. (2007) Genetic structure in a swarming brown long-eared bat (*Plecotus auritus*) population: evidence for mating at swarming sites. *Conservation Genetics* **8**: 913–928.

Grant W. A. S., Bowen B. W. (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity* **89**: 415–426.

Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.

Halliburton R. (2004) *Introduction to population genetics*. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Hansson B., Hasselquist D., Tarka M., Zehtindjiev P., Bensch S. (2008) Postglacial colonisation patterns and the role of isolation and expansion in driving diversification in a passerine bird. *PLoS ONE* **3**: e2794.

Harmata W. (1981) Longevity record for the lesser horseshoe bat. *Acta Theriologica* **26**: 507.

Hartl D. L., Clark A. G. (2007) Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Hasegawa M., Kishino H., Yano T. (1985) Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**: 160–174.

Hedrick P. W. (1999) Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* **53**: 313–318.

Helversen O. von, Heller K. G., Mayer F., Nemeth A., Volleth M., Gombkötö P. (2001) Cryptic mammalian species: a new species of whiskered bat (*Myotis alcaethoe* n. sp.) in Europe. *Naturwissenschaften* **88**: 217–23.

Hewitt G. M. (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87–112.

Hewitt G. M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907–913.

Hewitt G. M. (2004) The structure of biodiversity - insights from molecular phylogeography. *Frontiers in zoology* **26**: 1: 4.

Huelsenbeck, J. P., Ronquist F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754–755.

Hutterer R., Ivanova T., Meyer-Cords C., Rodrigues L. (2005) Bat migrations in Europe: a review of banding data and literature. *Naturschutz und Biologische Vielfalt* **28**: 1–176.

Juste J., Ibáñez C., Trujillo D., Muñoz J., Ruedi M. (2003) Phylogeography of barbastelle bats (*Barbastella barbastellus*) of Western Mediterranean and the Canary Islands. *Acta Chiropterologica* **5**: 165–175.

Juste J., Ibáñez C., Muñoz J., Trujillo D., Benda P., Karataş A., Ruedi M. (2004) Mitochondrial phylogeography of the long-eared bats (*Plecotus*) in the Mediterranean Palearctic and Atlantic Islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 1114–1126.

Karl S. A., Bowen B. W., Avise J. C. (1992) Global population genetic structure and male-Mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of Anonymous nuclear loci. *Genetics* **131**: 163–173.

Kerth G., 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., König B. (2000) Mitochondrial DNA (mtDNA) reveals that female Bechstein's bats live in closed societies. *Molecular Ecology* **9**: 793–800.

Kerth G., Mayer F., Petit E. (2002) 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. (2002) Mean colony relatedness is a poor predictor of colony structure and female philopatry in the communally breeding Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **52**: 203–210.

Kerth G., Petrov B., Conti A., Anastasov D., Weishaar M., Gazaryan S., Jaquiéry J., König B., Perrin N., Bruyndonckx N. (2008) Communally breeding Bechstein's bats have a stable social system that is independent from the postglacial history and location of the populations. *Molecular Ecology* **17**: 2368–2381.

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**: 557–66.

Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111–120.

Kohn M. H., York E. C., Kamradt D. A., Haught G., Sauvajot R. M., Wayne R. K. (1999) Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society, Series B* **266**: 657–63.

Kotlík P., Deffontaine V., Mascheretti S., Zima J., Michaux J. R., Searle J. B. (2006) A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14860–14864.

Kruskal J. B. (1956) On the shortest spanning subtree of the graph and the travelling salesman problem. *Proceedings of the American Mathematical Society* **7**: 48–57.

Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* **9**: 299–306.

Librado P., Rozas J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451–1452.

Lloyd B. D. (2003) Intraspecific phylogeny of the New Zealand short-tailed bat *Mystacina tuberculata* inferred from multiple mitochondrial gene sequences. *Systematic Biology* **52**: 460–76.

Manni F., Guérard E., Heyer E. (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm”. *Human Biology* **76**: 173–190.

Michaux J. R., Filippucci M.-G., Libois R. M., Fons R., Matagne R. F. (1996) Biogeography and taxonomy of *Apodemus sylvaticus* (the woodmouse) in the Tyrrhenian region: enzymatic variations and mitochondrial DNA restriction pattern analysis. *Heredity* **76**: 267–277.

Monmonier M. S. (1973) Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis* **3**: 245–261.

Moritz C. (1994) Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**: 373–375.

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

Nei M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York.

Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 3321–3323.

Nei, M., Li W. H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 5269–5273.

Ngamprasertwong T., Mackie I. J., Racey P. A., Piertney S. B. (2008) Spatial distribution of mitochondrial and microsatellite DNA variation in Daubenton's bat within Scotland. *Molecular Ecology* **17**: 3243–3258.

Nielsen R., Wakeley J. (2001) Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics* **158**: 885–896.

Nylander J. A. A. (2004) MrModeltest 2.1. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University

Parsons K. N., Jones G. (2003) Dispersion and habitat use by *Myotis daubentonii* and *Myotis nattereri* during the swarming season: implications for conservation. *Animal Conservation* **6**: 283–290.

Petersons G. (2004) Seasonal migrations of north-eastern populations of Nathusius' bat *Pipistrellus nathusii* (Chiroptera). *Myotis* **40–41**: 29–56.

Petit E., Mayer F. (1999) Male dispersal in the noctule bat (*Nyctalus noctula*): where are the limits? *Proceedings of the Royal Society Series B* **266**: 1717–22.

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

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

Petri B., Pääbo S., von Haeseler A., Tautz D. (1997) Paternity assessment and population subdivision in a natural population of the larger mouse-eared bat *Myotis myotis*. *Molecular Ecology* **6**: 235–242.

Podlutzky A. J., Khritankov A. M., Ovodov N. D., Austad S. N. (2005) A new field record for bat longevity. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* **60**: 1366–1368.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

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.

Ramos-Onsins S. E., Rozas J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 2092–2100.

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.

Rivers N. M., Butlin R. K., Altringham J. D. (2006) Autumn swarming behaviour of Natterer's bats in the UK: Population size, catchment area and dispersal. *Biological Conservation* **127**: 215–226.

Rogers A. R., Harpending H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 552–569.

Rozen S., Skaletsky H. J. (2000) Primer3 on the [www.http://frodo.wi.mit.edu/primer3/](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.

Ruczyński 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., 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.

Ruedi M., Walter S., Fischer M. C., Scaravelli D., Excoffier L., Heckel G. (2008) Italy as a major Ice Age refuge area for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) in Europe. *Molecular Ecology* **17**: 1801–1814.

Russell A. L., Medellín R. A., McCracken G. F. (2005) Genetic variation and migration in the mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Molecular Ecology* **14**: 2207–2222.

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

Salgueiro P., Coelho M. M., Palmeirim J. M., Ruedi M. (2004) Mitochondrial DNA variation and population structure of the island endemic azorean bat (*Nyctalus azoreum*). *Molecular Ecology* **13**: 3357–3366.

Schmidt H. A., Strimmer K., Vingron M., von Haeseler A. (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**: 502–504.

Schmitt T. (2007) Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* **4**: 11.

Segelbacher G., Manel S., Tomiuk J. (2008) Temporal and spatial analyses disclose consequences of habitat fragmentation on the genetic diversity in capercaillie (*Tetrao urogallus*). *Molecular Ecology* **17**: 2356–2367.

Shiel C. B., 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.

Simmons N. B. (2005) Order Chiroptera Pp. 312–525 w Mammal species of the World. A taxonomic and geographic reference (Wilson D. E., Reeder D. M. red.) Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.

Sommer R. S., Nadachowski A. (2006) Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review* **36**: 251–265.

Spitzenberger F., Pialek J., Haring E. (2001) Systematics of the genus *Plecotus* (Mammalia, Vespertilionidae) in Austria based on morphometric and molecular investigations. *Folia Zoologica* **50**, 161–172.

Spitzenberger F., Strelkov P. P., Winkler H., Haring E. (2006) A preliminary revision of the genus *Plecotus* (Chiroptera, Vespertilionidae) based on genetic and morphological results. *Zoologica Scripta* **35**: 187–230.

Stamatis C., Suchentrunk F., Moutou K. A., Giacometti M., Haerer G., Djan M., Vapa L., Vukovic M., Tvrtković N., Sert H., Alves P. C., Mamuris Z. (2009) Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography* **36**: 515–528.

Steffens R., Zöphel U., Brockmann D. (2005) 40 Jahre Fledermausmarkierungszentrale Dresden: methodische Hinweise und Ergebnisübersicht. Materialien zu Naturschutz und Landschaftspflege. Sächsisches Landesamt für Umwelt und Geologie, Dresden, Germany.

Strelkov P. P. (1969) Migratory and stationary bats (Chiroptera) of the European part of the Soviet Union. *Acta Zoologica Cracoviensia* **14**: 393–440.

Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G., Cosson J. F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453–64.

Tajima F. (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* **105**: 437–460.

Tajima F. (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 597–601.

Tamura K., Nei M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 512–526.

Valiere N. (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* **2**: 377–379.

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.

Voje K. L., Hemp C., Flagstad Ø., Saetre G. P., Stenseth N. C. (2009) Climatic change as an engine for speciation in flightless Orthoptera species inhabiting African mountains. *Molecular Ecology* **18**: 93–108.

Voronoi, G., (1908) Nouvelles applications des paramètres continus à la théorie des formes quadratiques. *Journal für die reine und angewandte Mathematik* **134**: 198–287.

Ward, R. D., Skibinski D. O. F., Woodwark M. (1992) Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. *Evolutionary Biology* **26**: 73–157.

Weaver K. N., Alfano S. E., Kronquist A. R., Reeder D. M. (2009) Healing rates of wing punch wounds in free-ranging little brown myotis (*Myotis lucifugus*). *Acta Chiropterologica* **11**: 220–223.

Weyeneth N., Goodman S. M., Stanley W. T., Ruedi M. (2008) The biogeography of *Miniopterus* bats (Chiroptera: Miniopteridae) from the Comoro Archipelago inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* **17**: 5205–5219.

Wilkinson G. S., Chapman A. M. (1991) Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. *Genetics* **128**: 607–617.

Wilkinson G. S., Fleming T. H. (1996) Migration and evolution of lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* **5**: 329–39.

Wilkinson G. S., Mayer F., Kerth G., Petri B. (1997) Evolution of repeated sequence arrays in the D-loop region of bat mitochondrial DNA. *Genetics* **146**: 1035–1048.

Wilson E. O. (1992) The diversity of life. Harvard University Press, Cambridge, MA.

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

Worthington-Wilmer J. W., Hall L., Barratt E., Moritz C. (1999) Genetic structure and male-mediated gene flow in the ghost bat (*Macroderma gigas*). *Evolution* **53**: 1582–1591.

Wu H. L., Wan Q. H., Fang S. G. (2006) Population structure and gene flow among wild populations of the black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) based on mitochondrial DNA control region sequences. *Zoological Science* **23**: 333–340.

Zhang D. X., Hewitt G. M. (1996) Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 247–251.

Zink R. M., Drovetski S. V., Questiau S., Fadeev I. V., Nesterov E. V., Westberg M. C., Rohwer S. (2003) Recent evolutionary history of the bluethroat (*Luscinia svecica*) across Eurasia. *Molecular Ecology* **12**: 3069–3075.

Załącznik I. Spis wszystkich stwierdzonych haplotypów gacków brunatnych w Polsce.

	10	20	30	40	50	60	70
H1	ATATAGTATG	TATAATTGTG	CATAAAATTA	TATTCCCCAT	GAATA-TTAA	ACAAGTACAT	AAAGATATTA
H2	G.....
H3
H4A.....A.....G.....
H5A.....A.....G.....
H6
H7
H8A.....
H9G.....C.....
H10C.....	G.....
H11
H12T.....
H13
H14G.....
H15
H16
H17
H18
H19
H20
H21
H22
H23G.....A.....
H24G.....
H25C.....
H26G.....
H27A.....A.....
H28
H29
H30T.....
H31
H32A.....A.....G.....
H33
H34A.....A.....G.....
H35
H36G.....
H37
H38T.....
H39
H40
H41A.....
H42A.....A.....G.....
H43A.....A.....G.....
H44A.....A.....G.....
H45
H46A.....A.....G.....
H47A.....A.....G.....G.....
H48A.....A.....G.....
H49C.....
H50
H51A.....A.....G.....
H52G.....
H53G.....
H54G.....
H55G.....C.....
H56G.....
H57G.....C.....
H58
H59G.....
H60G.....
H61A.....A.....G.....
H62A.....A.....
H63A.....
H64C.....G.....
H65
H66
H67
H68
H69T.....
H70G.....
H71
H72A.....

H73
H74 C
H75
H76
H77 A A G G
H78 A
H79
H80 A
H81
H82 A A G
H83 A A G G
H84 A A G
H85 A A
H86 A A G
H87 A A
H88 A A
H89 A A G
H90
H91 G A
H92 G T
H93 C G
H94 A A G C C
H95 A A G
H96 G
H97 G
H98
H99 C
H100 T
H101 C
H102 A A G G
H103 C
H104 C
H105 C TA C A T C A
H106 A A G
H107
H108 A A
H109 A A C
H110
H111
H112
H113 C
H114
H115 G
H116
H117 G A
H118 A A G
H119
H120

80 90 100 110 120 130 140

H1 ATACCACATA ATACATCATA TGTATAATCG TACATAATAT TATACTCCAC ATGAATATTA AACAAGTACA
H2
H3 G
H4 T C C
H5 T C
H6
H7
H8
H9
H10
H11
H12 T
H13
H14
H15
H16
H17 C
H18 C
H19
H20 C
H21
H22
H23
H24
H25 T
H26 C
H27 T C C
H28
H29
H30
H31
H32
H33
H34
H35
H36
H37
H38
H39
H40
H41
H42
H43
H44
H45
H46
H47
H48
H49
H50
H51
H52
H53
H54
H55
H56
H57
H58
H59
H60
H61
H62
H63
H64
H65
H66
H67
H68
H69
H70
H71
H72
H73
H74
H75
H76
H77
H78
H79
H80
H81
H82
H83
H84
H85
H86
H87
H88
H89
H90
H91
H92
H93
H94
H95
H96
H97
H98
H99
H100
H101
H102
H103
H104
H105
H106
H107
H108
H109
H110
H111
H112
H113
H114
H115
H116
H117
H118
H119
H120
H121
H122
H123
H124
H125
H126
H127
H128
H129
H130
H131
H132
H133
H134
H135
H136
H137
H138
H139
H140
H141
H142
H143
H144
H145
H146
H147
H148
H149
H150

H28							
H29		T.C.	T				
H30							
H31							C.
H32		T.C.		C			
H33							
H34		T.C.		CG			
H35							
H36		T					
H37			G.				
H38		T.C.					
H39					C.		
H40							
H41							
H42		T.C.		C.			
H43		T.C.		C.			
H44		T.C.					
H45		T.N.	G.				
H46		T.C.		C.			
H47		T.C.		C.			
H48		T.C.		C.			
H49					C.		
H50		T					
H51	C.	T.C.		C.			
H52							
H53		G.					
H54							
H55		T					
H56							
H57							
H58							
H59							
H60							
H61		T.C.		C.			
H62		T.C.		C.			
H63							
H64							
H65							
H66		T	G.				
H67	T.						
H68							T.
H69		T					
H70				G.			
H71			G.				
H72		T					
H73			T				
H74				C.	C.		
H75							
H76	G.						
H77	C.	T.C.		C.		C.	
H78							
H79							
H80		T					
H81							
H82		T.C.					
H83	C.	T.C.					
H84		T.C.		C.			
H85							
H86		T.C.		C.			
H87		T.C.		C.			
H88		T.C.		C.			
H89		T.C.	T	C.			
H90							
H91							
H92	C.	T					
H93							
H94		T.C.		C.			
H95		T		C.			
H96							
H97							
H98							
H99		T					
H100							
H101		C.					
H102		T.C.		C.			
H103		C.					
H104		T					

H105T.....
H106T.C.....C.....
H107T.C.....C.....
H108T.C.....C.....
H109T.C.....C.....
H110
H111
H112
H113
H114T.....
H115
H116
H117 ..T.....
H118T.C.....
H119
H120

150 160 170 180 190 200 210

H1 TAAAGATATT AATACCACAT AGTACATTAC ATGTATGATC GTACATAATA TTATATTCCA CATGAATATC
H2G.....A.....T
H3G.....A.....T
H4A.....A.T.....C.....
H5A.....A.....C.....
H6G.....A.....T
H7A.....T
H8G.....AC.....A.....C.....T
H9G.....A.....T
H10G.....A.....T
H11G.....C.....A.....T
H12G.....A.....T
H13G.....A.....T
H14G.....A.....A.T.....T
H15G.....A.....T
H16G.....A.....T
H17G.....A.....A.....G.....T
H18G.....AC.....A.....T
H19G.....C.....A.....C.....G.....T
H20G.....A.....T.....T
H21G.....A.....C.....T
H22G.....A.....T
H23G.....A.....T
H24G.....A.....C.G.....T
H25G.....A.....T
H26G.....G.....A.....C.....T
H27A.....A.....C.G.....
H28A.....
H29G.....A.....A.....T
H30A.....
H31G.....A.....T
H32A.....A.....C.....
H33G.....A.....A.....G.....CT.....T
H34A.....A.....C.....
H35G.....A.....A.....C.....T
H36G.....A.....A.....G.....T
H37A.....A.....T
H38G.....A.....T
H39G.....A.....A.....G.T.....
H40G.....C.....T
H41G.....A.....T
H42A.....C.A.....C.....
H43A.....A.....C.....
H44A.....A.....C.....
H45G.....A.....A.....T
H46A.....A.....C.....
H47A.....A.....C.....
H48A.....A.....C.....
H49A.....A.....T
H50G.....A.....A.....G.....T
H51A.....A.....C.....T
H52G.....A.....A.....T.....C.....T
H53G.....A.....T
H54G.....A.....A.....G.....T
H55G.....A.....A.....T
H56G.....A.....A.....G.T.....T
H57G.....A.....A.....T.....T
H58G.....A.....A.....G.....T
H59G.....G.....A.....C.....T

H60	G.....	A..T	C.....	T
H61	A.....	A.....	C.....
H62	A.....	A.....	C.....
H63	G.....	A.....	T
H64	G.....	A.....	A.....	C.....	T
H65	G.....	A.....	A.....	T
H66	A.....	T
H67	G.....	A.....	A.....	T
H68	..A..	G.....	A.....	A.....	T
H69	.G..	G.....	A.....	G.....	T
H70	G.....	A.....	A.....	T
H71	A.....	T
H72	G.....	A.....	T
H73	G.....	A.....	C.....	T
H74	A.....	T
H75	G.....	A.....	T
H76	G.....	A.....	A.....	T
H77	A.....	A.....	C.....	T
H78	G.....	A.....	C.....	T
H79	G.....	A.....	T
H80	G.....	A.....	C.....	T
H81	G.....	A..T	T
H82	A.....	A.....	C.....
H83	A.....	A.....	C.....	T
H84	A.....	A.....	C.....
H85	G.....	A.....	T
H86	A.....	A.....	C..G
H87	A.....	A.....	C..G
H88	A.....	A.....	C..G
H89	G.....	A.....	A.....	C.....
H90	..A..	G.....	A.....	T.....	T
H91	G.....	A.....	T
H92	G.....	A.....	T
H93	G.....	A.....	T
H94	A.....	A.....	C..G
H95	T.....	A.....	A.....	C.....
H96	G.....	A.....	T
H97	G.....	A.....	T
H98	G.....	A.....	T
H99	G.....	A.....	T
H100	G.....	A.....	C.....	T
H101	G.....	T.....	A.....
H102	A.....	A..T	C.....	T
H103	G.....	T.....	A.....	T
H104	G.....	A.....	T
H105	G.....	A.....	T
H106	A.....	A.....	C..G
H107	A.....
H108	A.....	A.....	C.....
H109	A.....	A.....	C..G
H110	G.....	A.....	CT.....	T
H111	G.....	T.....	A.....	T
H112	G.....	A.....	T
H113	G.....	A.....	A.....
H114	G.....	A.....	C.....	T
H115	G.....	A.....	T
H116	G.....	A.....	A.....	C..G	T
H117	G.....	A.....	C.....	T
H118	A.....	A.....	C.....
H119	G.....	A.....	G..T
H120	A.....	T

	220	230	240	250	260	270	280
H1	AAGCAAGTAT	ATAAACATGT	TAATATTACA	TAATACATTG	AATGCGTGAT	CGTACATACC	CCATCAATTG							
H2
H3
H4	A	G.....
H5	A
H6
H7
H8
H9	C.....
H10
H11
H12	G.....
H13
H14

H15T.....G.....
H16
H17A.....
H18
H19
H20C.....
H21
H22
H23
H24
H25
H26
H27AG.....
H28
H29
H30
H31
H32A.....
H33
H34AG.....
H35
H36
H37G.....
H38
H39C.....
H40G.....
H41C.....
H42AG.....
H43A.....
H44G.....C.....A.....
H45
H46C.....A.....
H47A.....
H48AG.....
H49
H50
H51A.....
H52
H53
H54C.....
H55
H56
H57
H58C.....
H59A.....
H60
H61A.....
H62A.....
H63
H64T.....
H65
H66G.....
H67A.....
H68
H69
H70
H71G.....A.....
H72
H73
H74
H75
H76G.....
H77A.....
H78
H79C.....
H80C.....
H81
H82AG.....
H83A.....
H84A.....T.....
H85A.....
H86AG.....
H87AG.....
H88AG.....
H89C.....AG.....
H90
H91

H92
H93
H94 A G
H95 A G
H96
H97 G
H98
H99
H100
H101 C
H102
H103 C
H104
H105
H106 T A G
H107
H108 A
H109 A
H110
H111
H112
H113
H114
H115
H116
H117
H118 A
H119 G CA
H120

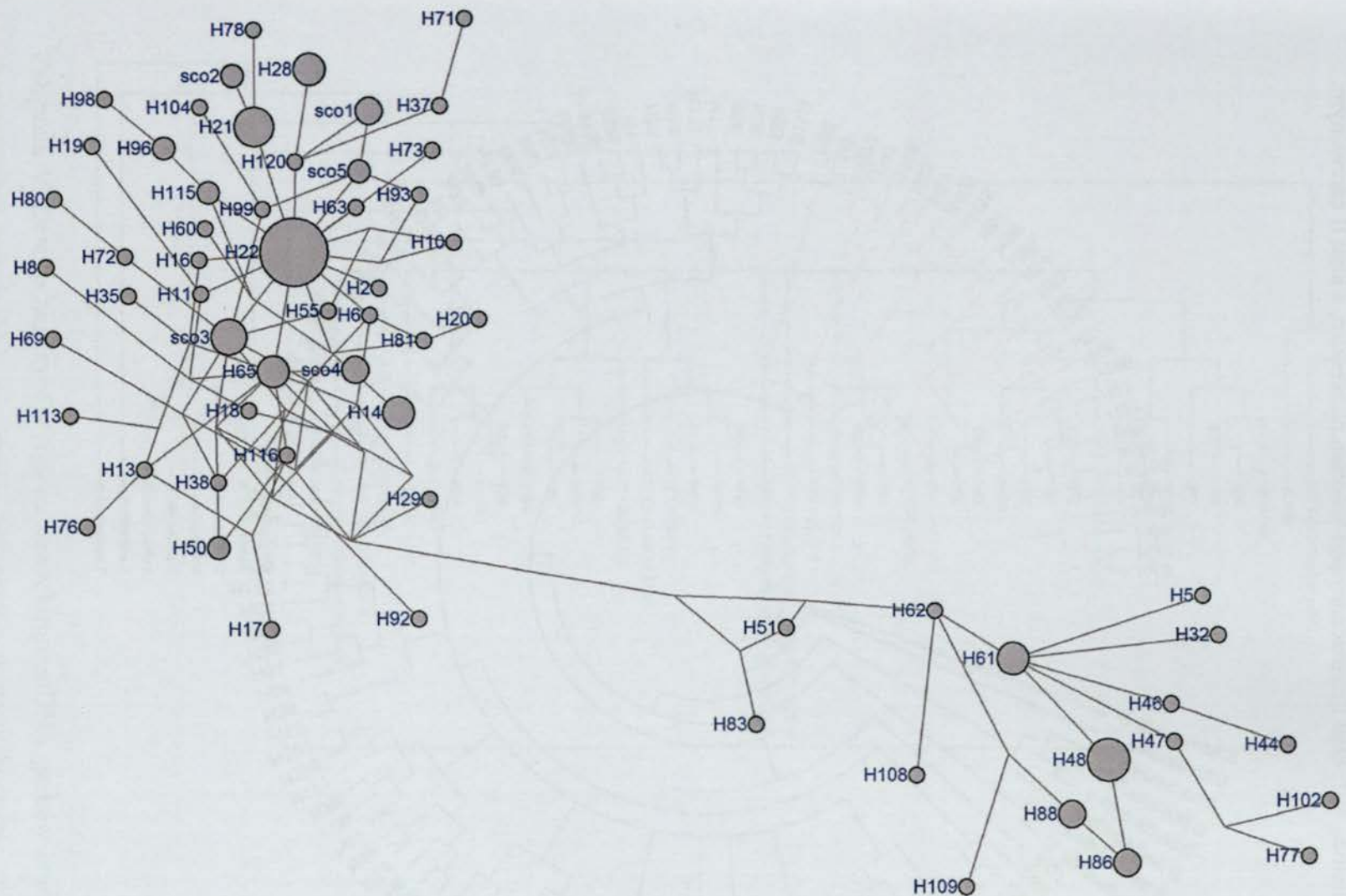
290 300 310 320 330 340

H1 AATATAATCC AAAACAACAC GGATATCCCC AACCAAAGTA GATCTAAGAA TTCAGCTACC TCC
H2
H3
H4 G
H5 G
H6 G
H7 G
H8
H9
H10
H11
H12
H13
H14
H15
H16 T
H17 G
H18
H19
H20 G
H21
H22
H23
H24
H25
H26
H27 G
H28
H29 G
H30
H31
H32 T
H33
H34 G
H35 T
H36
H37
H38
H39
H40
H41
H42 G
H43 G
H44 G
H45
H46 G

H47G.....
H48G.....
H49
H50
H51G.....
H52
H53
H54
H55
H56
H57
H58
H59
H60
H61G.....
H62G.....
H63
H64	A.....
H65
H66
H67
H68
H69G.....
H70
H71
H72
H73G.....
H74
H75G.....
H76
H77G.....
H78
H79
H80
H81G.....
H82G.....
H83G.....
H84G.....
H85T.....
H86G.....
H87G.....	C.....
H88G.....
H89G.....
H90
H91T.....
H92G.....
H93
H94G.....
H95G.....
H96	A.....
H97
H98T.....	A.....
H99
H100
H101
H102G.....
H103
H104C.....	.T.....
H105
H106G.....
H107	A.....
H108G.....
H109G.....
H110
H111
H112G.....
H113T.....
H114
H115
H116
H117
H118G.....	A.....
H119
H120

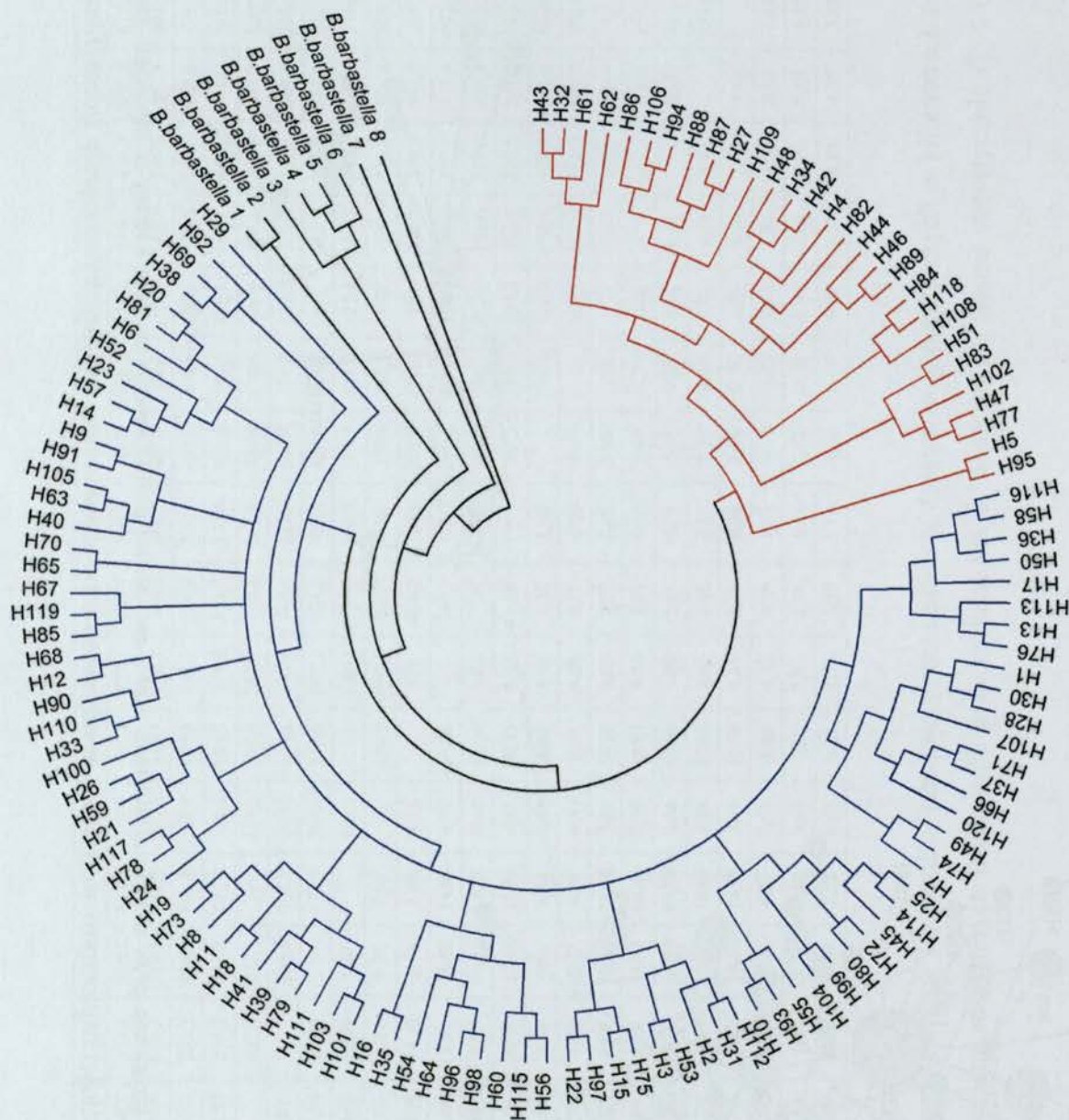
	JEL	MLY	CZAR	UNI	SLU	CHORZ	TRZY	BIA	WWA	GON	ANT	SZU	SZACH	TOM	PUL	LEZ	TAR	SOW	SUD	BES	ZBO	MRO	NAS
JEL		130,4	42,89	70,06	160,4	283,4	519,1	613,2	323,7	443,5	327,1	282,7	360,2	465	488,7	454,4	419,5	465,2	490,3	517,2	530,2	591,4	704,4
MLY	1,51		117,1	197,6	290,6	170,3	389,6	487,6	234,6	345,3	378,3	382,9	368,2	437,9	391,8	475	423,3	536,8	552,8	491,3	491,6	528,6	623,1
CZAR	-0,37	0,92		86,49	181,3	252,2	496,9	585,8	285,4	405,9	295,7	270,9	320,4	422,5	450,6	417,2	379,5	441,5	463,6	474,8	487,4	548,9	663,2
UNI	1,90	3,30	2,37		94,85	338,2	582,8	672,3	365,6	486,5	294,5	222,7	350,6	469,8	530,2	433,8	409,2	416,6	446	519,8	539,2	612,3	734,1
SLU	0,25	1,06	0,21	2,19		432,4	677,4	767	455,2	575,8	317,6	198,1	399,9	530,4	618,4	466,6	455,6	405,2	441,7	577,2	602,7	685,4	813,4
CHORZ	0,88	1,70	0,53	3,11	1,01		260,6	335,6	90,16	178,6	395,9	463,6	331,9	344,4	224,8	439,1	372,3	562,8	564,9	393,8	378,6	386,2	462,3
TRZY	15,82	16,27	14,34	17,58	17,50	17,00		123,3	298,6	255,6	647,2	724,2	563,4	524,9	269,3	661	589,4	811,8	808,1	561,1	525,8	471,3	465,4
BIA	14,27	14,67	12,68	15,99	15,99	13,98	1,37		343,1	257,3	690,3	788,3	590,9	523,5	248,9	677,1	605,5	848,4	838,1	549,8	506,9	428,2	386,8
WWA	1,56	2,10	0,99	2,83	1,73	1,51	9,23	7,09		120,9	350,7	446,7	266	257,6	165,2	368	298	513,8	509,6	305,6	288,6	299,8	388,7
GON	13,63	13,88	11,70	15,29	15,28	14,55	3,74	1,80	7,73		440	554,7	334,9	271,8	46,46	420	348,4	593,5	581,5	305,7	270,6	232,9	285,4
ANT	1,45	0,93	1,05	3,14	0,95	1,01	18,02	14,80	1,77	15,06		160,7	122,7	260,7	466,4	150,4	159,2	167,1	175,3	293,7	333,4	441,6	586,6
SZU	1,59	2,83	0,96	3,98	1,46	0,85	16,05	13,13	1,42	13,08	1,63		277	417,4	588,7	305,8	319,6	207,3	245,4	453,5	491,1	594,7	736,8
SZACH	0,07	0,88	-0,08	1,78	0,09	0,95	12,45	11,10	0,33	10,85	0,93	1,18		140,5	355,5	109,4	59,27	259,2	247,3	180,2	214,4	319,4	463,9
TOM	2,79	3,74	2,08	4,99	3,80	3,87	4,66	3,54	0,46	3,66	4,46	3,36	1,16		274,8	168,2	108,4	369,3	344,1	53,46	74,04	182,8	329,6
PUL	1,39	1,77	0,82	3,04	1,72	1,81	8,47	6,39	-0,17	5,76	1,88	1,71	-0,05	-0,17		432,3	361,8	614,6	599,4	301,6	260,9	204,2	241,2
LEZ	1,10	0,07	0,63	3,02	0,65	1,49	16,69	15,08	2,03	14,28	0,83	2,57	0,65	3,68	1,78		71,88	205,1	176,4	177,1	226,3	344,6	491
TAR	0,88	1,42	0,40	2,40	0,89	1,60	11,93	10,45	0,59	10,17	1,25	1,71	-0,18	1,49	-0,17	1,26		262,3	240,3	134,7	177	291	437,9
SOW	0,71	1,89	0,86	1,85	0,85	1,25	17,26	15,70	2,34	15,00	1,90	1,95	0,77	3,99	1,36	1,64	1,61		46,25	382,2	431,3	549,1	695,9
SUD	0,79	1,62	0,99	3,05	0,74	1,67	15,26	13,68	1,73	13,04	1,63	2,25	0,24	2,79	1,36	1,21	1,31	1,54		351,6	401,8	520,4	666,3
BES	1,24	1,82	0,85	3,02	0,98	2,03	14,79	13,35	1,69	12,75	1,95	2,39	0,50	2,96	0,78	1,58	0,85	1,80	1,69		51,25	169,5	314,7
ZBO	2,83	3,61	2,02	4,54	3,65	3,66	5,52	4,20	0,53	4,59	4,12	3,79	1,28	-0,54	-0,02	3,63	1,33	3,92	3,14	2,89		118,7	264,7
MRO	0,94	1,60	0,55	2,79	1,21	1,85	8,74	7,50	0,02	7,80	1,97	1,94	-0,16	0,12	-0,18	1,46	0,42	1,99	1,18	1,19	0,26		147
NAS	4,12	5,00	3,37	5,80	5,05	4,27	3,69	2,22	0,62	3,23	4,76	3,97	2,19	-0,72	0,04	5,09	2,19	5,11	4,05	3,88	-0,29	0,64	

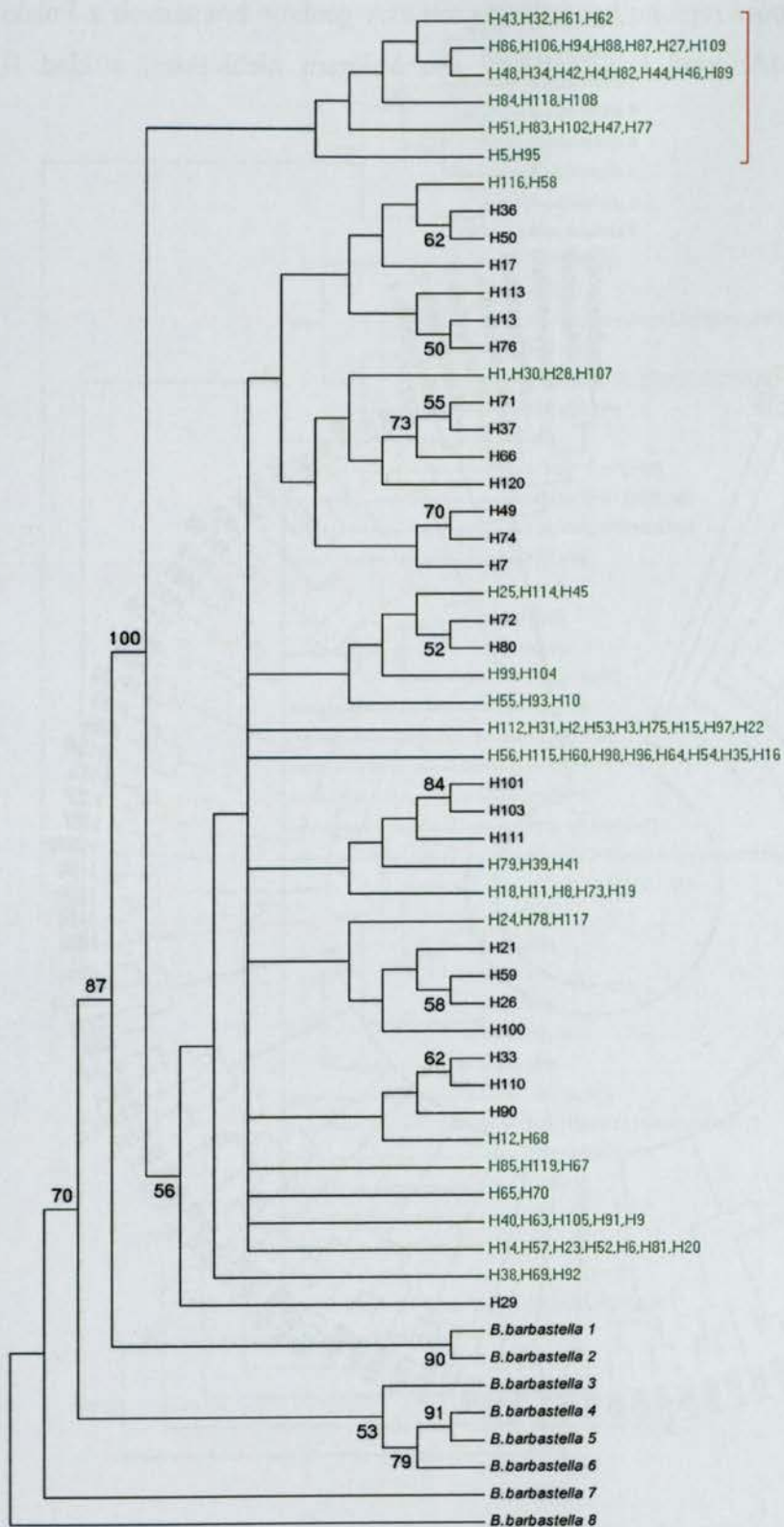
Załącznik II. Macierz dystansów genetycznych D_A (poniżej przekątnej) oraz macierz dystansów geograficznych w kilometrach (powyżej przekątnej) pomiędzy poszczególnymi lokalizacjami, dla których liczba prób była większa niż 5. Wartości D_A istotne statystycznie ($P < 0,05$) zaznaczone są wytłuszczoną czcionką.



Załącznik III. Sieć haplotypów uzyskana przy użyciu algorytmu *star contraction* definiującego w sieci klastry o topologii gwiazdy. Wielkość okręgów jest proporcjonalna do ilości haplotypów w klastrze. Węzły oznaczone sco stanowią wektory, które zostały zidentyfikowane jako węzły centralne.

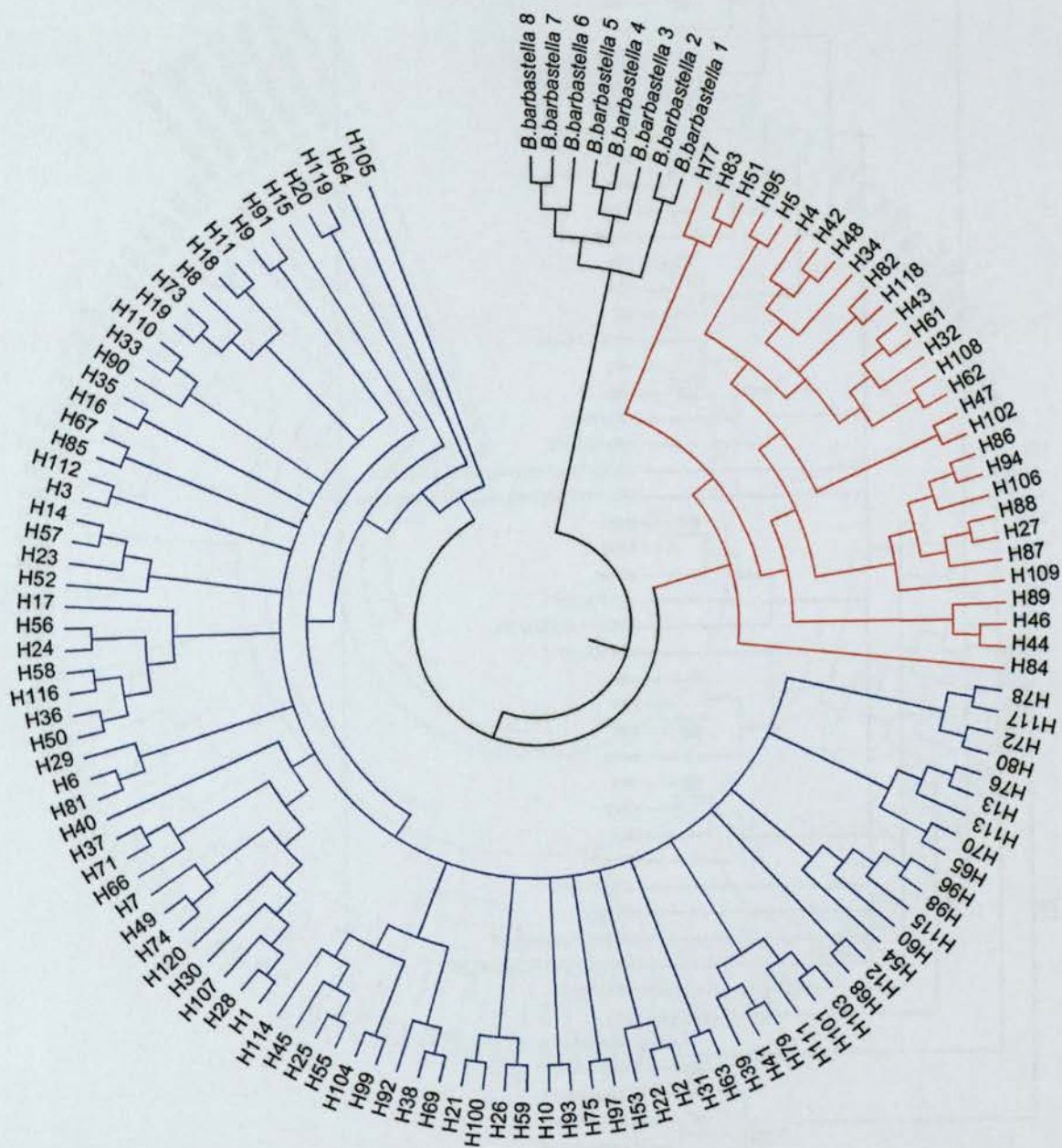
Załącznik IV. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Polski skonstruowane metodą N-J; kład I zaznaczony jest kolorem niebieskim, a kład II czerwonym.

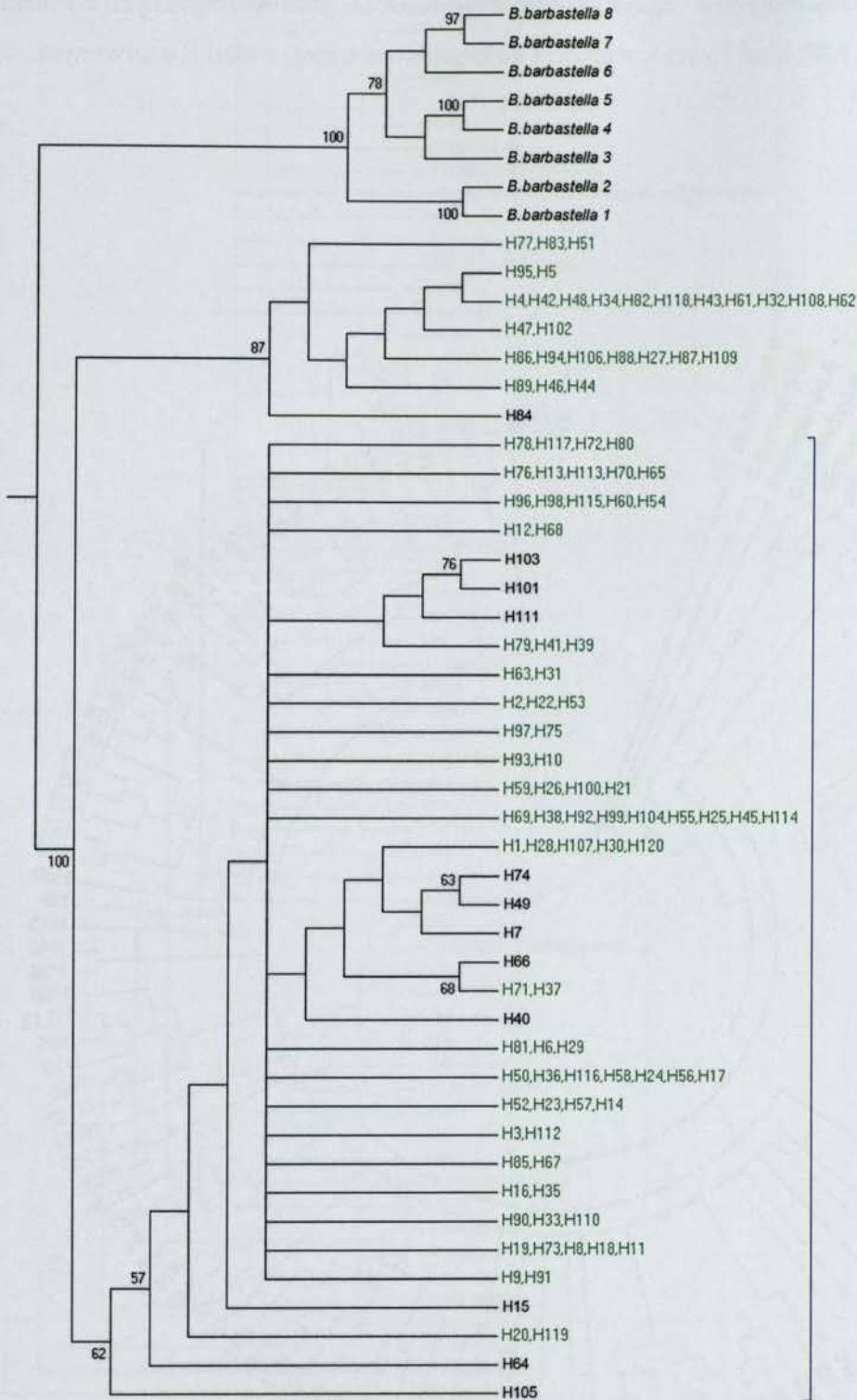




Załącznik V. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Polski skonstruowane metodą N-J; na drzewie zaznaczono wartości bootstrap co najmniej 50%. Kolorem zielonym zaznaczono haplotypy, wywodzące się z jednej gałęzi, które pogrupowano ze sobą w celu zwiększenia czytelności dendrogramu.

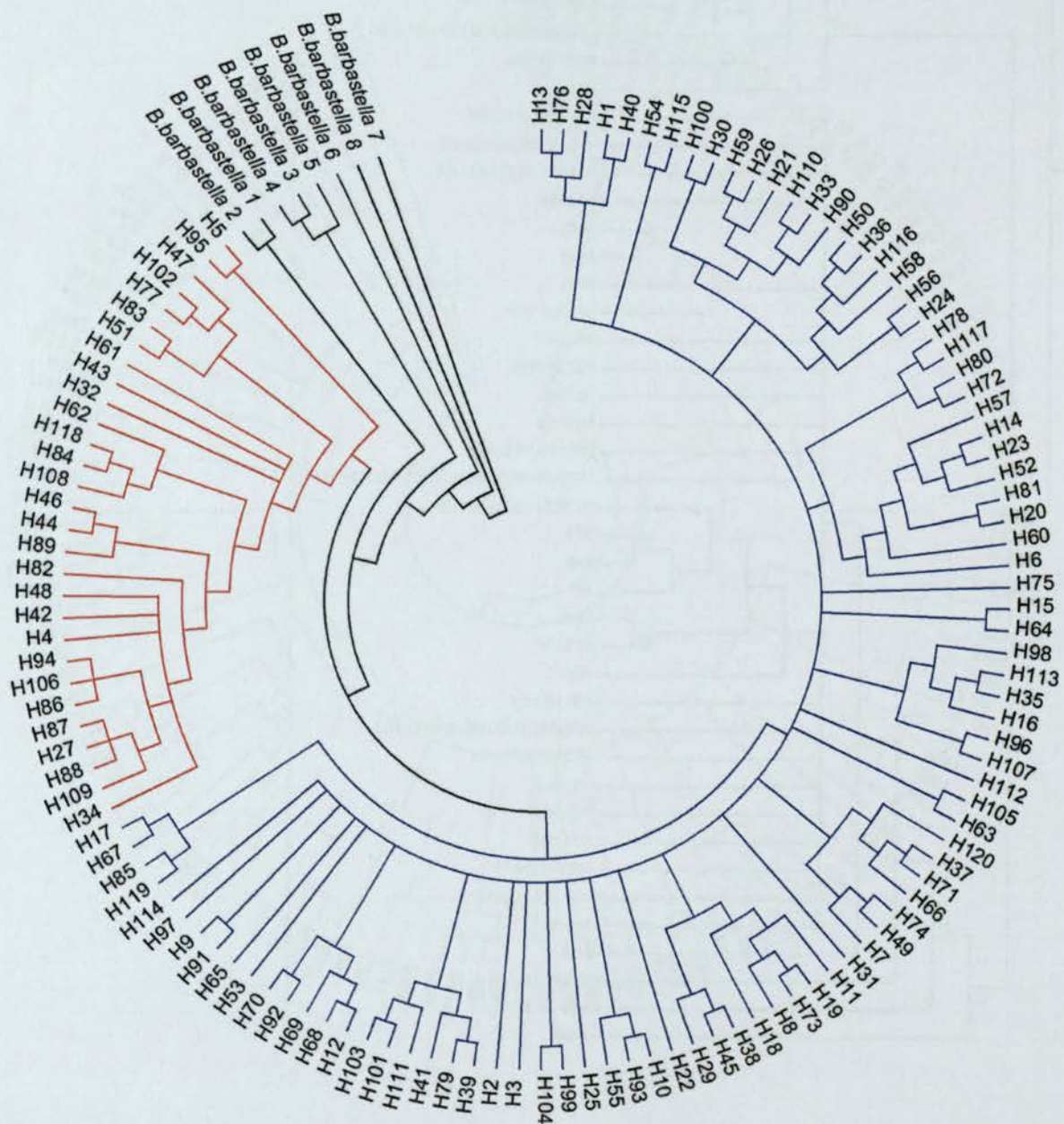
Załącznik VI. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Polski skonstruowane metodą UPGMA; kład I zaznaczony jest kolorem niebieskim, a kład II czerwonym.

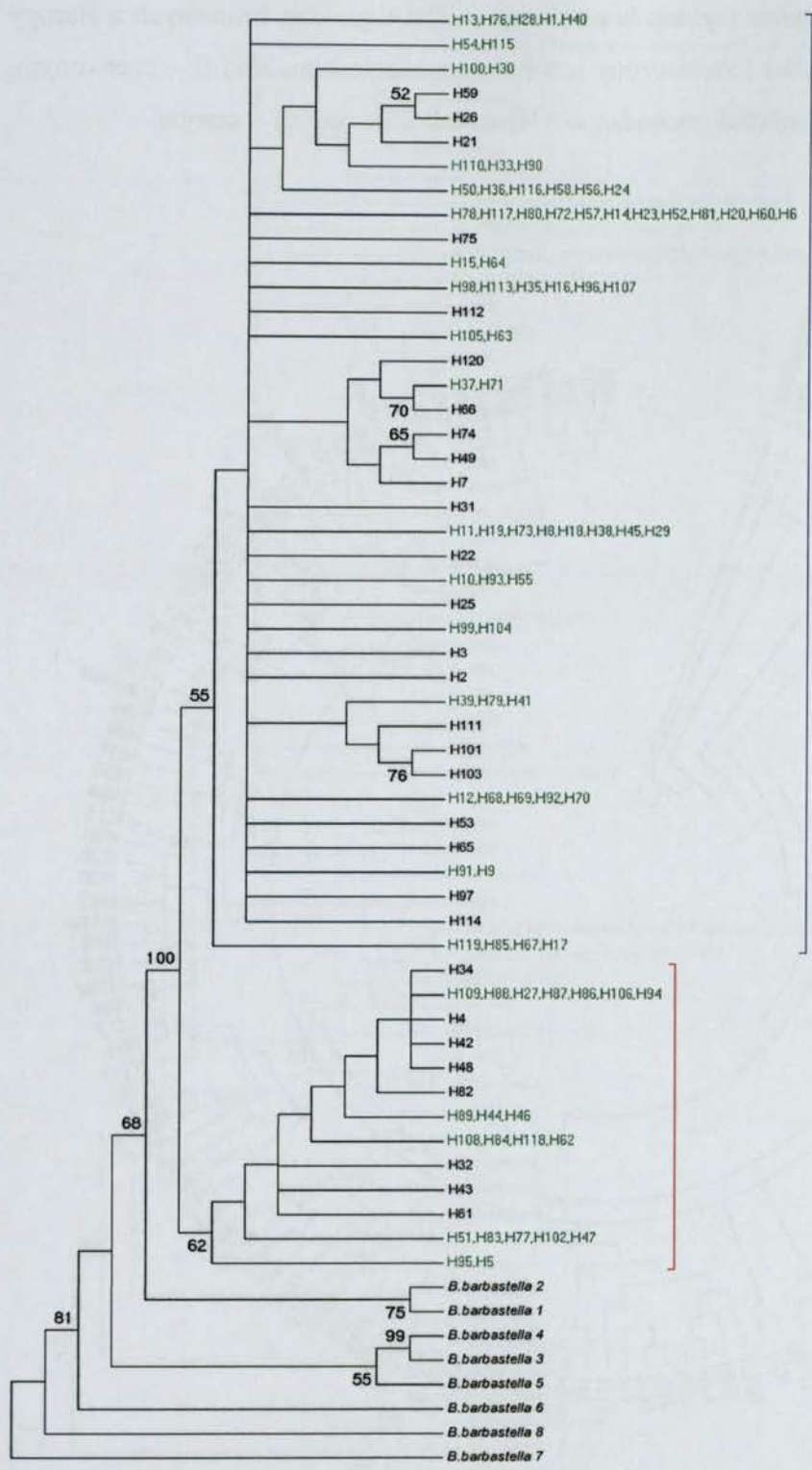




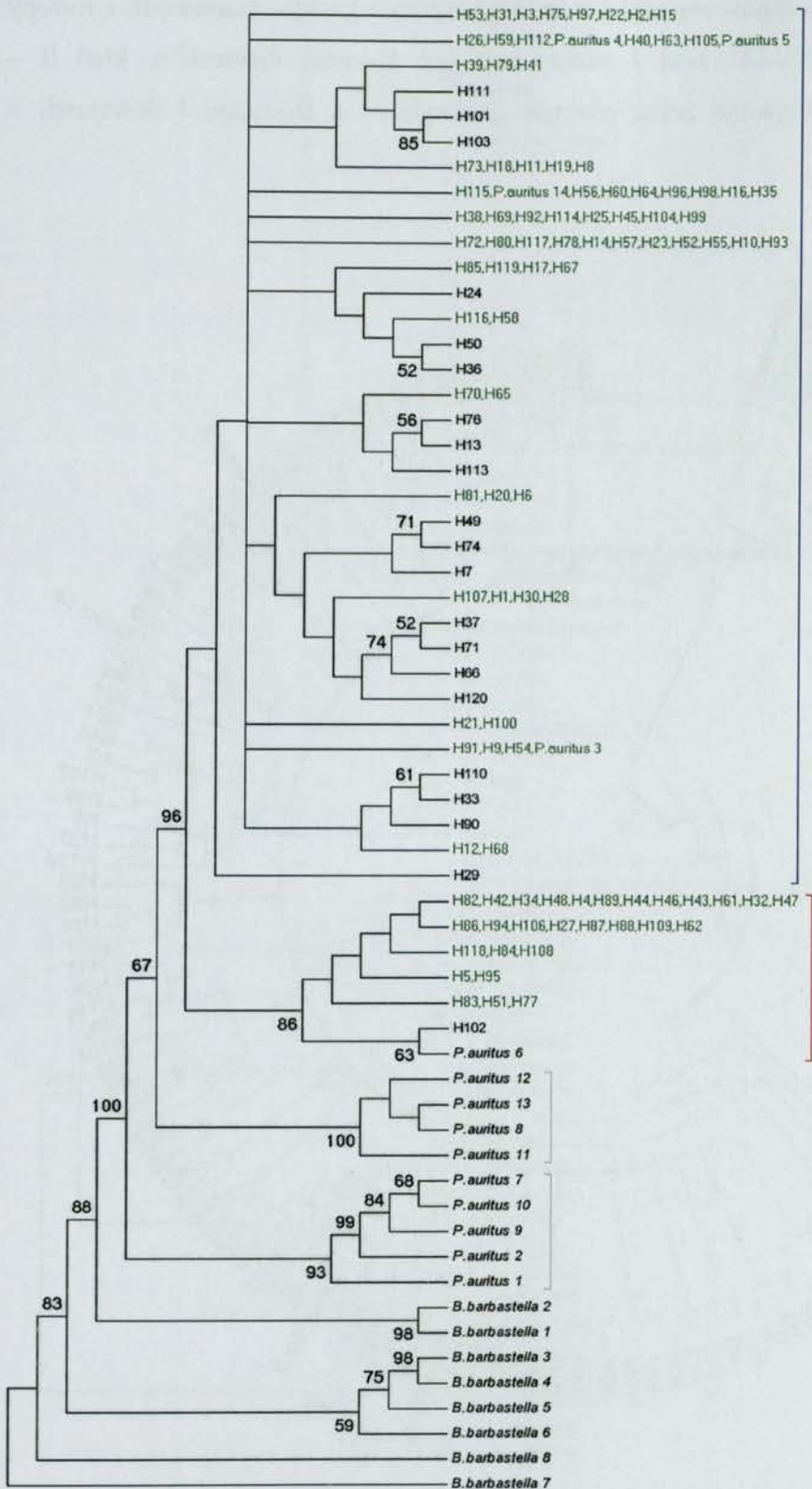
Załącznik VII. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Polski skonstruowane metodą UPGMA; na drzewie zaznaczono wartości bootstrap co najmniej 50%. Kolorem zielonym zaznaczono haplotypy, wywodzące się z jednej gałęzi, które pogrupowano ze sobą w celu zwiększenia czytelności dendrogramu.

Załącznik VIII. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Polski skonstruowane metodą MP; kład I zaznaczony jest kolorem niebieskim, a kład II czerwonym.



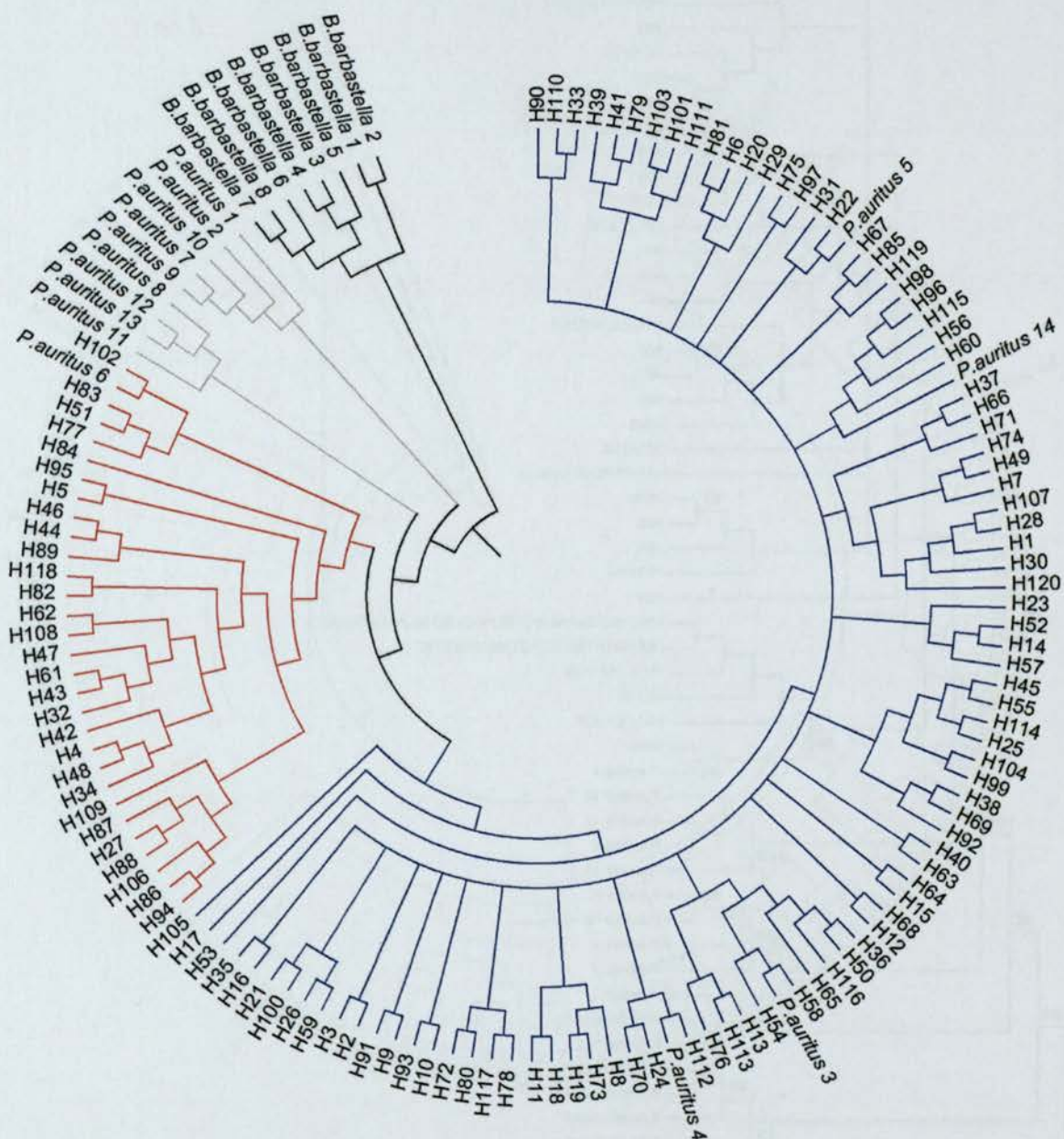


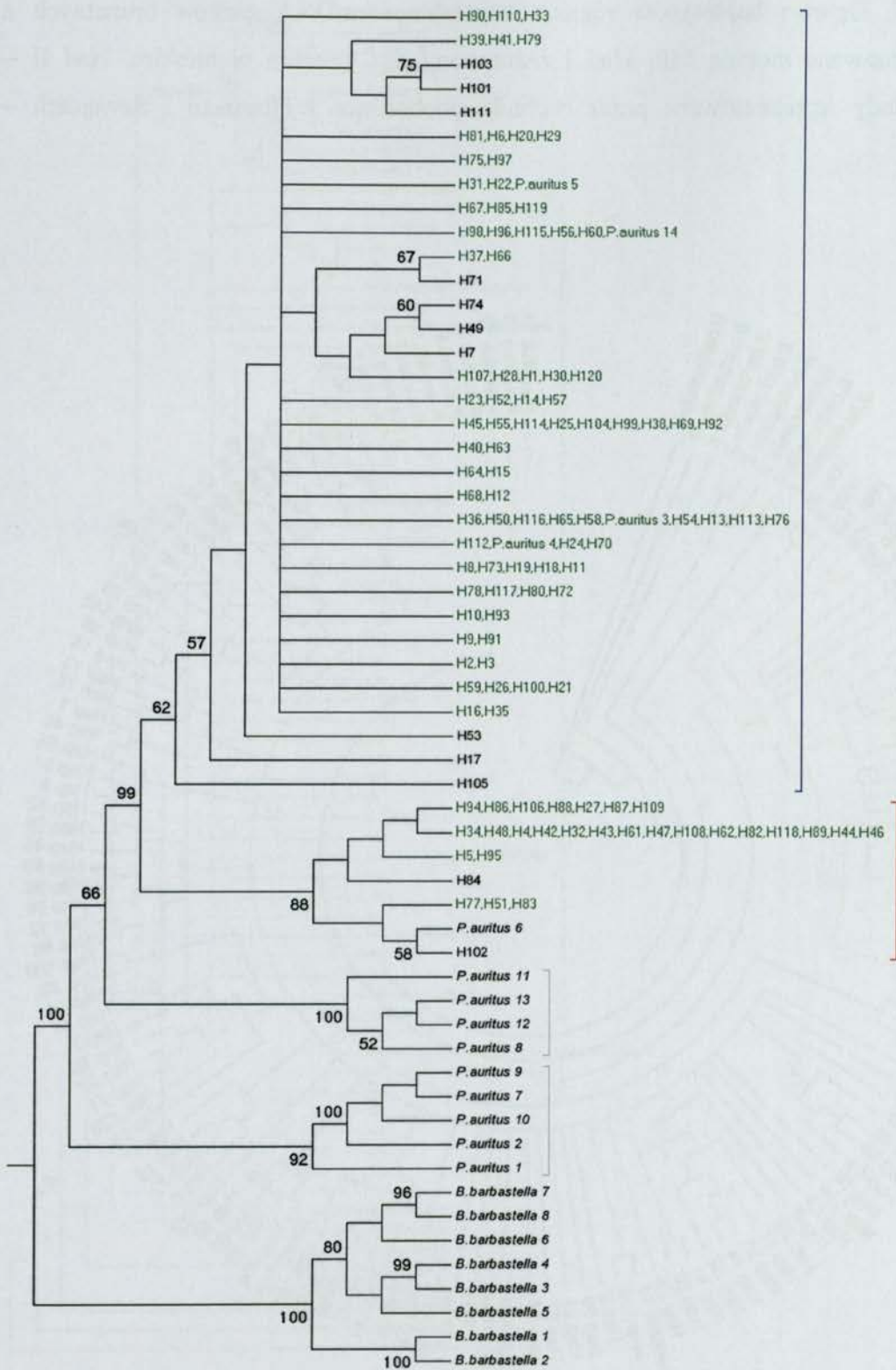
Załącznik IX. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Polski skonstruowane metodą MP; na drzewie zaznaczono wartości bootstrap co najmniej 50%. Kolorem zielonym zaznaczono haplotypy, wywodzące się z jednej gałęzi, które pogrupowano ze sobą w celu zwiększenia czytelności dendrogramu.



Załącznik XI. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Europy skonstruowane metodą N-J; na drzewie zaznaczono wartości bootstrap co najmniej 50%. Kolorem zielonym zaznaczono haplotypy, wywodzące się z jednej gałęzi, które pogrupowano ze sobą w celu zwiększenia czytelności dendrogramu.

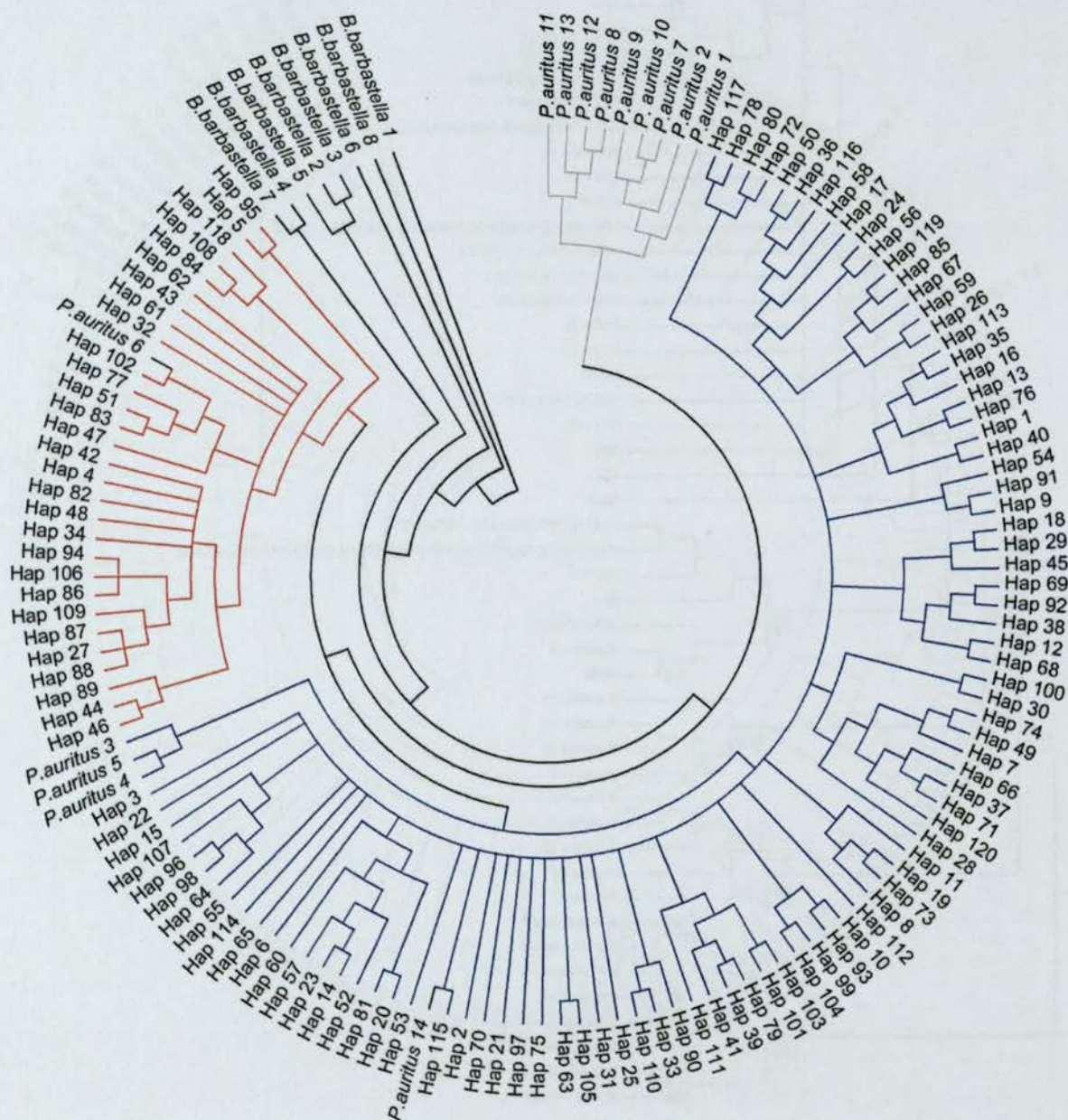
Załącznik XII. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Europy skonstruowane metodą UPGMA; kład I zaznaczony jest kolorem niebieskim, kład II – czerwonym, klady reprezentowane przez osobniki pochodzące z Hiszpanii i Szwajcarii – szarym.





Załącznik XIII. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Europy skonstruowane metodą UPGMA; na drzewie zaznaczono wartości bootstrap co najmniej 50%. Kolorem zielonym zaznaczono haplotypy, wywodzące się z jednej gałęzi, które pogrupowano ze sobą w celu zwiększenia czytelności dendrogramu.

Załącznik XIV. Drzewo haplotypów regionu kontrolnego mtDNA gacków brunatnych z Europy skonstruowane metodą MP; kład I zaznaczony jest kolorem niebieskim, kład II – czerwonym, klady reprezentowane przez osobniki pochodzące z Hiszpanii i Szwajcarii – szarym.



Muz. Inst. Zool. PAN
Biblioteka

K.35721