

JOANNA STOJAK

*Instytut Biologii Ssaków PAN
Waszkiewicza 1, 17-230 Białowieża
E-mail: jstojak@ibs.bialowieza.pl*

FILOGEOGRAFIA SSAKÓW W EUROPIE – KONCEPCJA BADAŃ I WYBRANE ZAGADNIENIA

WSTĘP

Filogeografia jest aktualnie jedną z najbardziej popularnych dziedzin badań w biologii. Badanie ewolucyjnych zależności między liniami genetycznymi z ich geograficznym rozmieszczeniem pozwalają zrozumieć, jakie czynniki miały istotny wpływ na obecne rozmieszczenie genów, populacji i gatunków. Zależności obserwowane pomiędzy różnymi populacjami stanowią niewątpliwie odzwierciedlenie historycznych procesów, kształtujących przepływ genów między nimi. Zależności te można prawidłowo zinterpretować jedynie po rozpatrzeniu i skorelowaniu dwóch istotnych aspektów: czasowego (przedstawiającego procesy ewolucyjne) oraz przestrzennego (analizującego rozmieszczenie geogra-

ficzne obserwowanej zmienności genetycznej).

Filogeografię jako odrębną dziedzinę badań po raz pierwszy zdefiniował Avise w 1987 r. Zgodnie z tą definicją filogeografia zajmuje się „...poznawaniem zasad i procesów rządzących geograficznym rozmieszczeniem linii rodowych (genetycznych), a w szczególności tych w obrębie jednego gatunku lub pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami” (AVISE i współaut. 1987, AVISE 2000). Prezentowany artykuł koncentruje się jedynie na filogeografii ssaków w Europie, próbując przybliżyć założenia oraz istotę badań tej niezwykle intensywnie rozwijającej się dziedziny.

ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA W OBRĘBIE POPULACJI (GATUNKÓW)

Pierwszymi markerami umożliwiającymi połączenie badań genetycznych i ekologicznych były allozymy, różne formy tego samego białka, odpowiadające różnym allelom (FREELAND 2008). Obecnie, aby zaprezentować genealogię linii genetycznych filogeografia wykorzystuje markerowe sekwencje DNA.

Podstawowymi, najczęściej stosowanymi są sekwencje mitochondrialne: cytochromu b (białka wchodzącego w skład kompleksu III łańcucha oddechowego) oraz pętli D (ang. D-loop), zwanej również rejonem kontrolnym (ang. control region, CR), będącym najszybciej ewoluującą częścią genomu mitochondrialnego (mtDNA) (AVISE 2000).

Analiza zmienności molekularnej pozwala na wyróżnienie linii filogenetycznych badanego gatunku, umożliwiając rekonstrukcję prawdopodobnych wzorów postglacjalnej rekolonizacji z różnych refugiów.

MtDNA występuje w komórce w dużej liczbie kopii, a jego kolistą strukturą zapewnia większą odporność na degradację. Jako charakterystyczny, powszechnie występujący w komórkach system umożliwia porównania pomiędzy różnymi organizmami. Jego prosta struktura (bez elementów powtarzalnych, transpozonów, pseudogenów czy intronów) zapewnia łatwą izolację i analizę, a dość szybko gromadzące się w nim substytu-

cje nukleotydowe odzwierciedlają przebieg historii gatunku. Co więcej, geny w mtDNA (zazwyczaj) nie ulegają rekombinacji (dziedziczenie klonalne) i genom mitochondrialny jest odpowiednikiem jednego locus (AVISE i współaut. 1987, AVISE 2004).

Należy jednak zwrócić uwagę na kilka poważnych ograniczeń, które niosą ze sobą tego typu analizy.

Genom mitochondrialny posiada mniejszą efektywną wielkość populacji niż geny autosomalne, ponieważ jest haploidalny i dziedziczony z reguły uniparentalnie (zatem wszystkie cząsteczki mtDNA są identyczne, tzw. homoplazmia¹). Skutkuje to tym, że mtDNA jest bardziej podatny na działanie dryfu genetycznego (m.in. na efekt wąskiego gardła), a zrekonstruowana na jego podstawie genealogia molekularna jest niekompletna (w przypadku transmisji matczynej potomstwo obu płci dziedziczy mtDNA od matki, jednak przekazywać go mogą dalej jedynie córki) i wymaga uzupełnienia poprzez porównanie z informacjami zawartymi w genomie jądrowym.

Markery jądrowego DNA umożliwiają charakterystykę struktury genetycznej populacji i wyznaczenie grup genetycznych w oparciu o analizę frekwencji alleli i wspólnych fragmentów oraz analizę geograficznego rozmieszczenia tych grup. Powszechnie stosowane są sekwencje mikrosatelitarne,

zawierające 10–50 powtórzeń motywu o długości do 6 par zasad, ale coraz większą popularnością zaczynają się cieszyć także zmiany (mutacje) punktowe (ang. single nucleotide polymorphism, SNP). Mutacje te stanowią najpowszechniejszą formę zmienności genetycznej, jednak wciąż są zbyt słabo scharakteryzowane u organizmów niemodelowych, co ogranicza wykorzystywanie ich w badaniach filogeograficznych (MORIN i współaut. 2004). Potencjalnym rozwiązaniem okazuje się intensywny rozwój wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania (ang. high-throughput sequencing) i niedawno opracowana metoda RAD tag (ang. restriction site-associated DNA tags), analizująca miejsca restrykcyjne w poszukiwaniu znajdujących się w ich obrębie mutacji punktowych, nawet w genomach organizmów niemodelowych (EMERSON i współaut. 2010).

Informacje uzyskane z danych molekularnych pozwalają odnaleźć wzajemne powiązania pomiędzy cząsteczkami mtDNA, rekonstrukcję geograficznego rozmieszczenia grup filogenetycznych oraz zbadanie wpływu wydarzeń historycznych na strukturę genetyczną (np. identyfikacja adaptacyjnych zmian w morfologii czy behawiorze, będących odpowiedzią na zmiany środowiskowe) (AVISE 2000).

REKONSTRUKCJA POKREWIEŃSTW MIĘDZY LINIAMI EWOLUCYJNYMI

Aby oszacować chronologię wydarzeń ewolucyjnych, a tym samym czas rozejścia się różnych linii ewolucyjnych w oparciu o liczbę mutacji, nagromadzonych w ich współczesnych odpowiednikach, stosuje się metodę zegara molekularnego (ZUCKERANDL i PAULING 1965).

Początkowo metoda ta zakładała stałe tempo mutacji (podczas gdy dziś wiadomo, że jest ono na różnych gałęziach i w różnych kładach zróżnicowane), neutralny charakter ewolucji molekularnej oraz identyfikowała ewolucję genów jako ewolucję gatunków.

Kalibracji zegara dokonywano poprzez porównanie z wiarygodnie datowanym zapisem kopalnym lub wydarzeniem paleogeograficznym. Należy jednak zauważyć, że

skamieniałości zazwyczaj reprezentują boczne linie ewolucyjne, oddzielone nie od bezpośredniego przodka, ale przed lub po zaistniałym procesie historycznym. Aby poprawnie ocenić czas dywergencji niezbędne jest posiadanie skamieniałości reprezentujących obie linie, jak najbliższej momentu ich rozdziału (HO i PHILLIPS 2009).

Brak wiarygodnie datowanych danych kopalnych odsyła badaczy do danych molekularnych. Filogenetyka, której narzędzia znajdują powszechne zastosowanie w filogeografii, definiuje gatunek jako najmniejszą grupę monofiletyczną, pochodzącą od wspólnego przodka (DE QUEIROZ i DONOGHUE 1990). Powodem powstania takiej grupy może być długotrwała izolacja lub bariera w przepły-

¹W przypadku, gdy oboje rodziców ma wkład w tworzenie puli pozajądrowej (tzw. przeciek ojcowski, dziedziczenie biparentalne) dochodzi do powstania heteroplazmii, czyli współistnienia w jednym osobniku dwóch lub więcej genotypów. Innym powodem powstawania heteroplazmii są mutacje (AVISE i współaut. 1987).

wie genów, odzwierciedlone zarówno w genomie jądrowym, jak i w mtDNA, w poszczególnych substytucjach nukleotydowych. Cechy genetyczne o pochodzeniu monofiletycznym (np. insercje SINE czy duplikacje genów) stanowią dobre markery filogenetyczne, niezależnie od tempa ewolucji sekwencji DNA (AVISE 2004). Prezentacja struktury populacji w postaci drzewa filogenetycznego ułatwia szacowanie relacji łączących poszczególne linie ewolucyjne i obliczenie dystansu genetycznego między nimi, obrazującego zaistniałe między nimi różnice (AVISE i współaut. 1987).

Obliczanie dystansów genetycznych pomiędzy homologicznymi sekwencjami z wykorzystaniem modelu substytucji DNA (np. KIMURA 1980) zakłada wartościowanie poszczególnych mutacji, przypisując odmienną wagę np. tranzycjom, transwersjom oraz zmianom synonimicznym i niesynonimicznym. Z kolei model bez korekty na wielokrotne podstawienia (p-distance) przedstawia dystans genetyczny jako proporcję miejsc nukleotydowych, w których dwie porównywane sekwencje są różne. Wynik uzyskiwany jest przez podział liczby różnic nukleotydowych przez całkowitą liczbę porównań, bez uwzględniania różnic w tempie ewolucji czy wartościowania poszczególnych rodzajów mutacji. Największe zastosowanie w praktyce znalazły narzędzia bioinformatyczne, korzystające z algorytmów ułatwiających wybór najbardziej odpowiedniego modelu substytucji DNA. Jednym z takich programów jest jModelTest. Program ten wdraża pięć różnych strategii wyboru modelu substytucji (POSADA i CRANDALL 2001).

Iloraz wartości oszacowanego czasu od rozpoczęcia różnicowania sekwencji do stopnia tego zróżnicowania stanowi tempo, w jakim „tyka” zegar molekularny. Na przykład teoria „uniwersalnego” zegara mitochondrialnego DNA zakłada, że w ciągu miliona lat obserwuje się 2% różnic między sekwencjami (BROWN i współaut. 1982). Oznacza to, że jeśli dwa gatunki zróżnicowały się na poziomie 2%, to albo ewoluują one niezależnie od 2 milionów lat, przyjmując zegar molekularny 1% na milion lat na każdej z dwóch gałęzi, albo od 10 milionów lat, przyjmując 0,2 na milion lat (FREELAND 2008). Kalibracji „uniwersalnego” zegara mtDNA dokonano z wykorzystaniem danych o sekwencjach ssaków naczelnych, wykorzystywano go jednak także w innych grupach taksonomicznych. Założenie o uniwersalności zegara molekularnego

jest jednak znacznym uproszczeniem, gdyż tempo substytucji DNA jest różne nie tylko w obrębie różnych grup taksonomicznych, ale również w różnych regionach DNA, a nawet w obrębie tego samego regionu (np. na pierwszej, drugiej i trzeciej pozycji kodonu). Co więcej, tempo ewoluowania danej sekwencji nie musi być stałe przez cały okres różnicowania. Często nowopowstałe gatunki ewoluują bardzo szybko, by wraz z upływem czasu proces ten uległ spowolnieniu (MINDELL i HONEYCUTT 1990).

Doprowadziło to do powstania wielu metod „rozluźniających” zasadę zegara molekularnego – jedne opisują tempo ewolucji jako proces ciągły, inne nie wyjaśniają go wcale, skupiając się raczej na parametrach indywidualnych dla każdej gałęzi (LEPAGE i współaut. 2007). Zegary „uniwersalne” zastąpiono zegarami „lokalnymi”, szacującymi oddzielne tempo ewolucji molekularnej dla każdej zbliżonej grupy gałęzi w drzewie (AVISE 2004, DRUMMOND i współaut. 2006, LEPAGE i współaut. 2007). Parametryczne modele Bayesowskie umożliwiają tworzenie różnorodnych modeli alternatywnych, z których każdy odnosi się do innych, specyficznych założeń (np. zmian w tempie zachodzących substytucji, kształt drzewa filogenetycznego) (LEPAGE i współaut. 2007). Z kolei test relatywnego tempa analizuje zmienność w tempie ewolucji molekularnej, porównując dystanse genetyczne między każdą parą taksonów i oceniając liczbę zmian w każdej linii od czasów ostatniego wspólnego przodka (BROMHAM i PENNY 2003). Obecnie kalibracja zegara wspomagana jest przez konkretne rozkłady statystyczne przedziałów (a nie punktów) kalibracyjnych (DRUMMOND i współaut. 2006, LEPAGE i współaut. 2007, HO i PHILLIPS 2009).

Prezentacja rekonstrukcji zależności pomiędzy różnymi liniami ewolucyjnymi w postaci drzewa filogenetycznego możliwa jest jednak i bez kalibracji zegara molekularnego. Drzewa filogenetyczne mogą być ukorzenione (historia populacji z uwzględnieniem wspólnej sekwencji początkowej, przodka) i nieukorzenione (opisujące jedynie zależności między danymi liniami, bez odniesienia do sytuacji wyjściowej). Rozgałęzienie przedstawia moment, w którym jedna linia rozdzieliła się na dwie potomne (im dawniej żył wspólny przodek, tym bardziej oddzielone są od siebie analizowane linie).

Wśród metod konstrukcji drzew filogenetycznych wyróżnić można dwie grupy: te oparte na grupowaniu (ang. clustering), czy-

li algorytmach iteracyjnych umożliwiającym uszeregowanie danych w zhierarchizowanej kolejności, oraz te oparte na poszukiwaniu (ang. searching), czyli zakładające wybór opcji najbardziej prawdopodobnej według ustalonych kryteriów, poprzedzone uzyskaniem puli wyników prawdopodobnych.

W przypadku analiz filogeograficznych metoda największej wiarygodności (ang. maximum likelihood, ML), rozpatruje wszystkie otrzymane drzewa jako alternatywne hipotezy wyjaśniające analizowane zależności ewolucyjne.

Wśród licznych metod opartych na analizie prawdopodobieństwa, w filogeografii istotne zastosowanie mają metody Bayesowskie, pozwalające na uzyskanie reprezentatywnego zbioru drzew, dla których prawdopodobieństwo wystąpienia danego dendrogramu jest proporcjonalne do iloczynu jego wiarygodności i prawdopodobieństwa *a priori*. Konstruowanie dendrogramów z wykorzystaniem programu MrBayes zakłada zastosowanie w obliczeniach modeli

Monte Carlo dla łańcuchów Markova (ciągów zdarzeń, w których prawdopodobieństwo każdego zdarzenia zależy jedynie od wyniku poprzedniego) (RONQUIST i HUELSENBECK 2003, HIGGS i ATTWOOD 2005, DRUMMOND i współaut. 2006). Łańcuchy Markova są algorytmami pozwalającymi m.in. na oszacowanie parametrów takich jak np. parametry demograficzne czy topologia i długość gałęzi. Metoda ta ma na celu odnalezienie odpowiedniego układu oszacowanych wybranych parametrów, obrazującego z największym prawdopodobieństwem obserwowany wzór zróżnicowania analizowanych sekwencji (CAVALLI-SFORZA i EDWARDS 1967, FELSENSTEIN 1981).

Innym, niezwykle istotnym aspektem badań filogeograficznych jest identyfikacja najmłodszego wspólnego przodka (ang. most recent common ancestor, MRCA). Umożliwia to metoda koalescencji, opierająca się na teorii matematycznej KINGMANA (1982), opisującej genealogie selektywne genów neutralnych, cofając się w czasie.

TEORIA KOALESCENCJI A FILOGEOGRAFIA STATYSTYCZNA

Metoda koalescencji pozwala na odtworzenie wstecz historii ewolucyjnej zidentyfikowanych w określonym locus alleli. Koncepcja teorii jest prosta – jeśli cofniemy się w czasie odpowiednio daleko, wszystkie allele tego locus w populacji powinny połączyć się w jeden allel ancestralny (FREELAND 2008). Statystyczne modele koalescencji muszą uwzględnić parametry demograficzne (np. wielkość populacji), ewolucyjne (np. efekt wąskiego gardła) czy ekologiczne (m.in. tempo migracji) (FREELAND 2008).

W przypadku braku danych dotyczących dywergencji wielu loci i/lub wielu osobników w subgatunku/subpopulacji, teoria koalescencji jest istotnym narzędziem w odtwarzaniu ich filogenezy (HICKERSON i współaut. 2010). Ze względu na ścisłe powiązanie koalescencji alleli z liczebnością populacji, teoria koalescencji znajduje również szerokie zastosowanie w filogeografii statystycznej (ang. statistical phylogeography), gdyż pozwala m.in. na szacowanie efektywnej wielkości populacji ancestralnej, poziomu migracji oraz testowanie alternatywnych hipotez demograficznych (KNOWLES i MADDISON 2002, RICHARDS i współaut. 2007).

Filogeografia statystyczna dąży do wyjaśnienia rzeczywistych przyczyn powstania

obserwowanej, konkretnej struktury filogeograficznej, wydobywając niezbędne do testów informacje bezpośrednio ze zmienności analizowanego genu, zamiast z drzew filogenetycznych (KNOWLES i MADDISON 2002). Testowanie coraz większej liczby czynników, często nie skorelowanych ze sobą, udziela znacznie lepszej odpowiedzi wyjaśniającej obserwowaną strukturę filogeograficzną. Zastosowanie statystyki pozwala w końcu na odtworzenie wydarzeń niezwykle skomplikowanych ewolucyjnie, najbliższych prawdziwemu przebiegowi historii gatunku (np. dywergencja w populacji z różnym tempem migracji) (KNOWLES i MADDISON 2002, RICHARDS i współaut. 2007).

W przypadku testowania alternatywnych hipotez dotyczących czasu dywergencji, modele koalescencji pozwalają ustalić, czy obserwowane rozmieszczenie geograficzne odzwierciedla proces historyczny (proces zachodzący raz lub najwyżej kilka razy w czasie od teraźniejszości do rozdzielenia się ancestralnej, homologicznej cząsteczki DNA, np. fragmentacja populacji, ekspansja, efekt wąskiego gardła) czy proces genetyczny (np.: przepływ genów, dryf genetyczny, system kojarzenia) (TEMPLETON 2006, RICHARDS i współaut. 2007).

Wyzwaniem wciąż pozostaje tworzenie modeli, które wyjaśniają przebieg historii gatunku w najprostszy sposób. Gromadzone jednak, coraz pełniejsze zasoby informacji filogenetycznych, geograficznych i statystycz-

nych, prowadzą do rozwoju coraz nowszych metod testujących nie tylko już postawione hipotezy, ale i oszacowywanie nowych parametrów (RICHARDS i współaut. 2007).

GEOGRAFICZNA INTERPRETACJA WZORÓW ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ

Rekonstruując ewolucyjną historię gatunków/populacji nie wolno pominąć czynników geograficzno-środowiskowych. Modele filogeograficzne powinny uwzględniać zatem informacje o preferencjach ekologicznych badanego gatunku/populacji oraz informacje abiotyczne (temperatura, topografia, opady atmosferyczne, wilgotność, gleba, wegetacja) (KOZAK i współaut. 2008). W tym celu wykorzystuje się system informacji geograficznej (ang. geographic information system, GIS).

GIS umożliwia przypisanie danym genetycznym lokalizacji na mapie, wraz z charakteryzującymi ją warunkami środowiska, a tym samym umożliwia wizualizację genealogii w przestrzeni. GIS stanowi zbiór wielu różnych warstw z przypisanymi do nich danymi dotyczącymi środowiska biotycznego (np. typ wegetacji) oraz abiotycznego (np. klimat, geologia). Informacje te są podstawą do tworzenia algorytmów, obliczających zmiany w rozmieszczeniu gatunków współcześnie i w przeszłości (RICHARDS i współaut. 2007).

Dane deponowane w bazach danych GIS zbierane są przy użyciu dwóch metod. Metoda odległego odczytu (ang. remote sensing) wykorzystuje sensory satelitarne w celu zidentyfikowania przestrzennych różnic w energii elektromagnetycznej i generowania cyfrowych obrazów danych środowiskowych (m.in. poziom wegetacji). Z kolei metoda przestrzennej interpolacji (ang. spatial interpolation) stanowi procedurę statystyczną, szacującą wartości poszczególnych danych, charakteryzujących analizowane lokalizacje (np. ze stacji pogodowych) (HICKERSON i współaut. 2010). Zebrane w ten sposób dane służą następnie do statystycznego oszacowania warunków środowiskowych innych, zbliżonych geograficznie lokalizacji.

Porównanie danych środowiskowych z map GIS z informacjami o rozmieszczeniu określonego gatunku umożliwia oszacowanie arealów, w których gatunek występuje i jego preferencji środowiskowo-geograficz-

nych. Metoda ta jest nazywana modelowaniem niszy ekologicznej (GUISAN i THUILLER 2005, GUISAN i ZIMMERMANN 2000).

W przypadku filogeografii GIS ma istotne znaczenie w przedstawianiu historycznych zmian klimatycznych, zasięgu lodowca, zmian temperatur, historycznych zasięgów gatunków, stanowiące podsumowanie danych uzyskanych ze skamieniałości, danych palinologicznych i paleośrodowiskowych, danych statystycznych, a nawet kopalnego DNA (ang. ancient DNA, aDNA) (KOZAK i współaut. 2008, CARSTENS i współaut. 2009).

System informacji geograficznej stanowi zatem podstawowe narzędzie w filogeografii porównawczej (ang. comparative phylogeography), zajmującej się porównywaniem wzorców zróżnicowania genetycznego pomiędzy różnymi gatunkami, których rozmieszczenie geograficzne jest lub było zbliżone. Oznacza to, że gatunki z podobną strukturą filogeograficzną powinny odpowiadać na zachodzące zmiany środowiskowe w bardzo podobny sposób (KOZAK i współaut. 2008). Założenia te pozwalają na rekonstrukcję i porównanie historycznego przepływu genów w sąsiadujących ze sobą populacjach, a także na wyjaśnienie relatywnego wpływu znanych procesów historycznych na współczesne wzorce bioróżnorodności (HICKERSON i współaut. 2010). Identyfikacja zaszłych zmian klimatycznych, genetycznych, demograficznych i przestrzennych (np. stanowiących barierę izolującą geny) ułatwia ostateczne odtworzenie hipotezy, która w najbardziej prawdopodobny sposób wyjaśni obserwowaną zmienność genetyczną (KOZAK i współaut. 2008, HICKERSON i współaut. 2010).

Podczas gdy modelowanie niszy ekologicznej pozwala na postawienie hipotez dotyczących niedawnych wydarzeń środowiskowych, naukowcy szukają sposobu umożliwiającego badania historyczno-demograficzne. Podstawą jest odtworzenie historii powstania i ewolucji taksonu wyjściowego, prowadzących do zaistnienia obserwowanej struktury genetycznej populacji.

Tworzenie alternatywnych hipotez ułatwia określenie relatywnego wpływu różnych procesów historycznych (np. dywergencji, zmiany wielkości i podziały populacji, mi-

gracji, hybrydyzacji) na obserwowane modele demograficzne historii taksonu wyjściowego (CARSTENS i współaut. 2009).

CZYNNIKI KSZTAŁTUJĄCE STRUKTURĘ FILOGEOGRAFICZNĄ SSAKÓW W EUROPIE

Struktura filogeograficzna określa zróżnicowanie genetyczne pomiędzy populacjami osobników tego samego gatunku w obrębie jego zasięgu. Jej właściwy opis jest niezwykle istotny w analizach, o których traktuje ten artykuł. Jak już wspomniano we wstępie, filogeografia jest nauką łączącą aspekt genetyczny z rozmieszczeniem geograficznym i nie sposób zatem ignorować istotnego wpływu czynników geograficznych na strukturę filogeograficzną. Jest to zależne oczywiście od formy oraz czasu, w jakim oddziaływały na określoną populację.

Na terenie Europy największy wpływ na rozmieszczenie ssaków miały niewątpliwie naturalne bariery geograficzne (łańcuchy górskie, morza) oraz cykliczne zmiany klimatu w czwartorzędzie, wywołane przez zmiany w nasłonecznieniu Ziemi (HAYS i współaut. 1976, CRUZAN i TEMPLETON 2000, SOMMER i NADACHOWSKI 2006). Był to okres ostatniego zlodowacenia (ang. last glacial maximum, LGM) (23 000–18 000 lat temu), przerywanego okresami ocieplenia, tzw. interglacjałami (szacunkowo 20% trwania czwartorzędu) (FROGLEY i współaut. 1999). Zajęcie części terenów lądowych Europy przez lądolód wywołało istotne zmiany w rozmieszczeniu gatunków ssaków. Większość zwierząt wycofała się na południe, na obszary tzw. refugium glacialnych (Półwyspy Apeniński, Bałkański i Iberyjski), w których panowały bardziej sprzyjające warunki, umożliwiające przetrwanie LGM. Udowadniają to liczne skamieniałości gatunków takich jak jeleni szlachetny (*Cervus elaphus*), sarna europejska (*Capreolus capreolus*), łos (*Alces alces*), mamut (*Mammuthus primigenius*) i wiele innych (SOMMER i NADACHOWSKI 2006). Dobrze poznana historia filogeograficzna niedźwiedzia brunatnego (*Ursus arctos*) wykazuje, że tuż przed i zaraz po okresie wielkiego zlodowacenia (LGM) gatunek ten występował na terenach Europy Centralnej. Jednakże w czasie LGM zmuszony był wycofać się na obszary śródziemnomorskich półwyspów, ale i przetrwał także w regionie karpackim (SOMMER i NADACHOWSKI 2006).

Dane kopalne wykazują istnienie refugium w Europie także na wyższych wysokościach, tzw. północnych refugium kryptycznych (np. w Karpatach) (SOMMER i NADACHOWSKI 2006). Analizy sekwencji markerowych mtDNA małych ssaków (nornicy rudej *Myodes glareolus* czy łasicy *Mustela nivalis*) również potwierdzają tę tezę (KOTLIK i współaut. 2006, WÓJCIK i współaut. 2010, McDEVITT i współaut. 2012).

Obecnie tereny stanowiące refugia glacialne cechuje wyższe zróżnicowanie genetyczne i bogactwo gatunkowe niż tereny wtórnie zasiedlane po ustąpieniu lodowca. Analizy dowodów kopalnych oraz sekwencji markerów DNA umożliwiają poznawanie potencjalnych wzorców tej postglacialnej wędrówki rekolonizacyjnej, możliwość przekraczania barier geograficznych i identyfikację wystąpienia w danej populacji efektu wąskiego gardła czy dryfu genetycznego.

Na przykład analizy sekwencji markerów mitochondrialnego DNA współczesnych i starożytnych europejskich populacji wilka *Canis lupus* wykazały istnienie dwóch haplotypów, z których jeden przeważał w populacji starożytnej, a drugi w populacji współczesnej. Oznacza to, że dawniej dominujący haplotyp został wyparty w ciągu kilku tysięcy lat. Przypuszcza się, że może być to wynikiem adaptacji do zmieniających się warunków klimatycznych (PILOT i współaut. 2010).

Badania filogeograficzne dążą także do określenia miejsc, w których przebiegają strefy wtórnego kontaktu między różnymi gatunkami lub liniami genetycznymi, tzw. suture zones.

Na terenie Europy opisano do tej pory 6 głównych stref wtórnego kontaktu, w tym jedną na obszarze Polski (JAAROLA i SEARLE 2002, SCHMITT 2007). Stwierdzono, iż dochodzi w niej do kontaktu pomiędzy dwoma liniami nornicy rudej *Myodes glareolus* (karpacka i wschodnia) (WÓJCIK i współaut. 2010), różnymi grupami chromosomowymi ryjówki aksamitnej *Sorex araneus* (WÓJCIK 1993) oraz dwoma gatunkami *Crociodura* (PUCEK i RACZYŃSKI 1983). Ostatnio potwierdzono również istnienie w Polsce strefy

wtórnego kontaktu dla łasicy *Mustela nivalis* (MCDEVITT i współaut. 2012). Prowadzone badania filogeograficzne mają za zadanie potwierdzić, czy na obszarze Polski dochodzi także do kontaktu pomiędzy różnymi liniami genetycznymi innych gatunków.

Co ciekawe, strefy wtórnego kontaktu są obszarami najbardziej różnorodnymi genetycznie w Europie, bardziej niż refugia glacialne. Wywołane epoką lodowcową frag-

mentacja siedlisk i zasięgów, ograniczenie przepływu genów pomiędzy izolowanymi populacjami tych samych gatunków, często znajdujących schronienie w różnych refugium glacialnych promowały ewolucję odrębnych linii genetycznych (AVISE i współaut. 1987). Migracje w kierunku północnym powodowały dalsze zmiany, kreując nowe haplotypy.

PODSUMOWANIE

Filogeografia jest interdyscyplinarną nauką dążącą do odtworzenia historii ewolucyjnej gatunków i zrekonstruowania najbardziej prawdopodobnego „scenariusza” postglacialnej rekolonizacji. Zrozumienie, w jaki sposób populacje ewoluowały w ekstremalnych warunkach klimatycznych panujących w czwartorzędzie, może stanowić cenną wskazówkę do prognozowania wpływu zmian klimatu na współczesne populacje.

Obecnie filogeografia korzysta z dziedzin takich jak klimatologia czy geologia, analiz geoprzestrzennych oraz bioinformatyki. Jest w stanie zidentyfikować i zrekonstruować wydarzenia takie jak hybrydyzacja czy introgresja, a także odtworzyć geograficzne i środowiskowe czynniki wpływające na przepływ genów (HICKERSON i współaut. 2010).

Pojęcie filogeografii jest bardzo szerokie. Nauka ta rekonstruuje pokrewieństwa między liniami ewolucyjnymi oraz opisuje zmienność molekularną w obrębie gatunków i populacji, korzystając z informacji zawartej w sekwencjach DNA. Filogeografia interpretuje również zmienność genetyczną w oparciu o czynniki geograficzno-środowiskowe, a dobrze opracowane modele koalescencji pozwalają na inferencję demograficzną taksonów ancestralnych i tworzenie alternatywnych modeli demograficzno-historycznych opisujących ewolucję molekularną prowadzącą do powstania obserwowanych u ssa-

ków struktur filogeograficznych. Włączenie do badań metod statystycznych niewątpliwie rozbudowało możliwości analiz filogeograficznych.

Na koniec należy wspomnieć jeszcze o genetyce krajobrazowej (ang. landscape genetics), dziedzinie bliskiej filogeografii. Genetyka krajobrazowa analizuje oddziaływania pomiędzy czynnikami środowiskowymi (aspekt geograficzny) i genetyką populacyjną (zróżnicowanie genetyczne, procesy mikroewolucyjne: przepływ genów, selekcja naturalna i dryf genetyczny) (MANEL i współaut. 2003). Mimo podobnych arealów badań, genetyka krajobrazowa odnosi się tylko do populacji współczesnych, podczas gdy filogeografia skupia się również na aspekcie historycznym. Zauważyć jednak należy, że w przypadku analizowania procesów generujących współczesne wzorce rozmieszczenia zmienności genetycznej, filogeografia i genetyka krajobrazowa stanowią wzajemne uzupełnienie (WANG 2010).

Wciąż rosnący potencjał filogeografii niewątpliwie pozwala sądzić, że w niedługim czasie zgromadzimy pełniejszą wiedzę o historii ssaków w Europie od ostatniego zlodowacenia.

Podziękowania prof. dr hab. J. M. Wójcikowi za cenne uwagi i pomoc w opracowaniu artykułu.

FILOGEOGRAFIA SSAKÓW W EUROPIE – KONCEPCJA BADAŃ I WYBRANE ZAGADNIENIA

Streszczenie

Filogeografia zajmuje się poznawaniem zasad i procesów rządzących geograficznym rozmieszczeniem linii rodowych (genetycznych), a w szczególności tych w obrębie jednego gatunku lub pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami. W celu ustalenia i zobrazowania ewolucyjnych zależności pomiędzy liniami genetycznymi wykorzystywane są techniki

biologii molekularnej (jądrowe i mitochondrialne markery DNA), paleontologia (datowanie skamieniałości) oraz narzędzia bioinformatyczne. Informacje te pozwalają na scharakteryzowanie struktury filogeograficznej ssaków w Europie (m.in. identyfikację stref wtórnego kontaktu i terenów stanowiących refugia glacialne), odtworzenie najbardziej prawdopo-

dobnego scenariusza wtórnego zasiedlania terenów polodowcowych oraz oszacowanie wpływu ostatnie-

go zlodowacenia na postglacjalną historię ssaków w Europie.

PHYLOGEOGRAPHY OF MAMMALS IN EUROPE – RESEARCH CONCEPTION AND SELECTED QUESTIONS

Summary

Phylogeography is a field of study concerned with the principles and processes governing the geographic distributions of genealogical lineages, especially those within and among closely related species. To establish and illustrate the evolutionary relationships between genetic lineages nuclear and mitochondrial DNA markers, fossil records and bioinformatics are used. The obtained information has

allowed characterization of phylogeographic patterns in European mammal populations (e.g. identification of post-glacial suture zones and glacial refugia), reconstruction of the most probable post-glacial recolonization scenarios and estimation of how the Last Glacial Maximum influenced the post-glacial history of mammals in Europe.

LITERATURA

- AVISE J. C., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts and London.
- AVISE J. C., 2004. *Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja*. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa.
- AVISE J. C., ARNOLD J., BALL R. M., BIRMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J. E., REEB C. A., SAUNDERS N. C., 1987. *Intraspecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematic*. Ann. Rev. Ecol. Evol. Systemat. 18, 489–522.
- BROMHAM L., PENNY D., 2003. *The modern molecular clock*. Nat. Rev. 4, 216–225.
- BROWN W. M., PRAGER E. M., WANG A., WILSON A. C., 1982. *Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution*. J. Mol. Evol. 18, 225–239.
- CARSTENS B. C., STOUTE H. N., REID N. M., 2009. *An information theoretical approach to phylogeography*. Mol. Ecol. 18, 4270–4282.
- CAVALLI-SFORZA L. L., EDWARDS A. W. F., 1967. *Phylogenetic analysis: models and estimation procedure*. Am. J. Human Genet. 19, 233–257.
- CRUZAN M. B., TEMPLETON A. R., 2000. *Paleoecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record*. Trends Ecol. Evol. 15, 491–496.
- DE QUEIROZ K., DONOGHUE M. J., 1990. *Phylogenetic systematics and species revisited*. Cladistics 6, 83–90.
- DRUMMOND A. J., HO S. Y. W., PHILLIPS M. J., RAMBAUT A., 2006. *Relaxed phylogenetics and dating with confidence*. PLoS Biology 4, e88.
- EMERSON K. J., MERZ C. R., CATCHEN J. M., HOHENLOHE P. A., CRESKO W. A., BRADSHAW W. E., HOLZAPFEL C. M., 2010. *Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 16196–16200.
- FELSENSTEIN J., 1981. *Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach*. J. Mol. Evol. 17, 368–376.
- FREELAND J. R., 2008. *Ekologia molekularna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- FROGLEY M. R., TZEDAKIS P. C., HEATON T. H. E., 1999. *Climatic variability in northwest Greece during the last interglacial*. Science 285, 1886–1889.
- GUISAN A., THUILLER W., 2005. *Predicting species distributions: offering more than simple habitat models*. Ecol. Lett. 8, 993–1009.
- GUISAN A., ZIMMERMANN N. E., 2000. *Predictive habitat distribution models in ecology*. Ecol. Model. 135, 147–186.
- HAYS J. D., IMBRIE J., SHACKLETON N. J., 1976. *Variation in the Earth's orbit: pacemaker of ice ages*. Science 194, 1121–1132.
- HICKERSON M. J., CARSTENS B. C., CAVENDER-BARES J., CRANDALL K. A., GRAHAM C. H., JOHNSON J. B., RISSLER L., VICTORIANO P. F., YODER A. D., 2010. *Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000*. Mol. Phylogenet. Evol. 54, 291–301.
- HIGGS P. G., ATTWOOD T. K., 2005. *Bioinformatics and molecular evolution*. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- HO S. Y., PHILLIPS M. J., 2009. *Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times*. Systemat. Biol. 58, 367–380.
- JAAROLA M., SEARLE J. B., 2002. *Phylogeography of field voles (Microtus agrestis) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences*. Mol. Ecol. 11, 2613–2621.
- KIMURA M., 1980. *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. J. Mol. Evol. 16, 111–120.
- KINGMAN J. E. C., 1982. *The coalescent*. Stochastic Proc. Their Applic. 13, 235–248.
- KNOWLES L. L., MADDISON W. P., 2002. *Statistical phylogeography*. Mol. Ecol. 11, 2623–2635.
- KOTLIK P., DEFFONTAINE V., MASCHERETTI S., ZIMA J., MICHAUX J. R., SEARLE J. B., 2006. *A northern glacial refugium for bank voles (Clethrionomys glareolus)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 14860–14864.
- KOZAK K. H., GRAHAM C. H., WIENS J. J., 2008. *Integrating GIS-based environmental data into evolutionary biology*. Trends Ecol. Evol. 23, 141–148.
- LEPAGE T., BRYANT D., PHILIPPE H., LARTILLOT N., 2007. *A general comparison of relaxed molecular clock models*. Mol. Biol. Evol. 24, 2669–2680.
- MANEL S., SCHWARTZ M. K., LUIKART G., TABERLET P., 2003. *Landscape genetics; combining landscape ecology and population genetics*. Trends Ecol. Evol. 18, 189–197.
- MCDEVITT A. D., ZUB K., KAWALKO A., OLIVER M. K., HERMAN J. S., WÓJCIK J. M., 2012. *Climate and refugial origin influence the mitochondrial lineage distribution of weasels (Mustela nivalis) in*

- a phylogeographic suture zone. *Biol. J. Linnean Soc.* 106, 57–69.
- MINDELL D. P., HONEYCUTT R. L., 1990. *Ribosomal RNA in vertebrates and phylogenetic applications*. *Ann. Rev. Ecol. Systemat.* 21, 541–566.
- MORIN P. A., LUIKART G., WAYNE R. K. i współaut., 2004. *SNPs in ecology, evolution and conservation*. *Trends Ecol. Evol.* 19, 208–215.
- PILOT M., BRANICKI W., JĘDRZEJEWSKI W., GOSZCZYŃSKI J., JĘDRZEJEWSKA B., DYKYY I., SHKVYRYA M., TSINGARSKA E., 2010. *Phylogeographic history of grey wolves in Europe*. *BMC Evol. Biol.* 10, 104–114.
- POSADA D., CRANDALL K. A., 2001. *Selecting the best-fit model of nucleotide substitution*. *Systemat. Biol.* 50, 580–601.
- PUCEK Z., RACZYŃSKI J., 1983. *Atlas rozmieszczenia ssaków w Polsce. Atlas of Polish mammals*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- RICHARDS C. L., CARSTENS B. C., KNOWLES L. L., 2007. *Distribution modelling and statistical phylogeography: an integrative framework for generating and testing alternative biogeographical hypotheses*. *J. Biogeogr.* 34, 1833–1845.
- RONQUIST F., HUELSENBECK J. P., 2003. *MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models*. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- SCHMITT T., 2007. *Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and post-glacial trends*. *Front. Zool.* 4, 1–13.
- SOMMER R. S., NADACHOWSKI A., 2006. *Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records*. *Mammal Rev.* 36, 251–265.
- TEMPLETON A. R., 2006. *Gene flow and population history*. [W:] *Population genetics and microevolutionary theory*. TEMPLETON A. R. (red.). John Wiley & Sons Inc., USA, 204–205.
- WANG I. J., 2010. *Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography*. *Mol. Ecol.* 19, 2605–2608.
- WÓJCIK J. M., 1993. *Chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* in Poland: a model of karyotype evolution*. *Acta Theriolog.* 38, 315–338.
- WÓJCIK J., KAWAŁKO A., MARKOVA S., JEREMY S., KOTLIK P., 2010. *Phylogeographic signatures of northward post-glacial colonization from high-latitude refugia: a case study of bank voles using museum specimens*. *J. Zool.* 281, 249–262.
- ZUCKERANDL E., PAULING L., 1965. *Evolutionary divergence and convergence in proteins*. *Evol. Genes Proteines*, 97–166.