



Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii



Magdalena Świsłocka

**Struktura genetyczna populacji łośia (*Alces alces*)
w dolinie Biebrzy**

Rozprawa doktorska

Wykonana w Zakładzie Zoologii Kręgowców
Promotor rozprawy: dr hab. Mirosław Ratkiewicz, prof. UwB

BIAŁYSTOK 2014

SPIS TREŚCI

PODZIĘKOWANIA.....	6
UWAGI WSTĘPNE.....	7
STRESZCZENIE.....	8
WSTĘP	11
Refugia glacialne, postglacialna kolonizacja Europy Centralnej i Północnej.....	11
Konsekwencje genetyczne postglacialnej ekspansji zasięgu gatunków.....	15
<i>Modele rekolonizacji ‘Phalanx’ i ‘Pioneer’ (sensu Nichols i Hewitt 1994)</i>	15
<i>Wtórne strefy kontaktu w Europie</i>	16
<i>Surfing genetyczny</i>	17
<i>Populacje reliktowe</i>	18
<i>Ewolucyjnie ważne jednostki i jednostki zarządzania</i>	20
Zastosowanie markerów molekularnych w badaniach populacyjnych.....	24
Historia populacji łośa na świecie i w Polsce.....	29
Cele pracy.....	35
MATERIAŁ I METODY	36
Obiekt badań.....	36
<i>Taksonomia gatunku</i>	36
<i>Biologia gatunku</i>	37
<i>Migracje sezonowe i długodystansowe</i>	38
Teren badań.....	39
Materiał do badań i liczebność prób.....	39
<i>Próby współczesne</i>	39
<i>Próby muzealne</i>	40
Analizy genetyczne.....	40
<i>Izolacja DNA genomowego</i>	40
<i>Izolacja DNA z prób tkankowych</i>	41
<i>Izolacja DNA z odchodów</i>	42
<i>Kategorie użytych markerów genetycznych</i>	42
<i>Mitochondrialny DNA (mtDNA)</i>	43
<i>Region kontrolny mtDNA (ang. control region, mtDNA-cr)</i>	43

<i>Cytochrom b mtDNA (cytb mtDNA)</i>	44
<i>Markery zlokalizowane na chromosomach Y i X</i>	44
<i>Mikrosatelitarny DNA</i>	46
<i>Gen MHC II DRB</i>	47
<i>Amplifikacja wybranych genów metodą PCR</i>	48
<i>Oczyszczanie DNA po reakcji PCR przed sekwencjonowaniem</i>	50
<i>Reakcja sekwencjonowania DNA</i>	50
<i>Usuwanie nieprzyłączonych terminatorów po reakcji sekwencyjnej</i>	51
<i>Elektroforeza produktów sekwencjonowania i analiza sekwencji nukleotydowych</i>	51
<i>Sekwencje genów mtDNA, MHC i zlokalizowanych na chromosomach Y i X</i> ..	51
<i>Rozdział produktów Multiplex-PCR (loci mikrosatelitarnego DNA)</i>	51
Analizy statystyczne.....	52
<i>Ocena poziomu błędów w genotypowaniu</i>	52
<i>Zmienność genetyczna populacji bazująca na sekwencjach nukleotydowych</i>	54
<i>Parametry mierzące różnicowanie genetyczne między populacjami dla sekwencji nukleotydowych</i>	56
<i>Zmienność genetyczna populacji w loci mikrosatelitarnego DNA</i>	56
<i>Współczynniki statystyki F (Wright 1951): F_{ST}, F_{IS} i R_{ST}</i>	57
<i>Izolacja przez dystans</i>	59
<i>Graficzna wizualizacja różnicowania między populacjami</i>	60
<i>Analiza składowych głównych</i>	60
<i>Analiza wariancji molekularnej (AMOVA)</i>	61
<i>Identyfikacja odrębnych grup genetycznych za pomocą programu Structure</i> ..	61
<i>Pokrewieństwo genetyczne</i>	62
<i>Przepływ genów między populacjami i identyfikacja migrantów</i>	63
<i>Identyfikacja sygnału doboru naturalnego</i>	64
Analizy filogenetyczne mitochondrialnego DNA.....	65
<i>Wybór modelu substytucji nukleotydowej</i>	65
<i>Przygotowanie danych do konstrukcji drzew filogenetycznych</i>	67
<i>Konstrukcja drzew filogenetycznych za pomocą metody dystansów: łączenia sąsiadów (NJ), metody maksymalnego prawdopodobieństwa</i>	

<i>(ML) oraz metody wnioskowania bayesowskiego</i>	68
<i>Sieci haplotypów</i>	71
<i>Datowanie zdarzeń ewolucyjnych</i>	72
<i>Rozkład liczby niedopasowań nukleotydowych (ang. mismatch distribution)</i>	73
WYNIKI	76
Mitochondrialny DNA – zmienność, dywergencja, struktura.....	76
<i>Sekwencje regionu kontrolnego mtDNA w populacjach współczesnych</i>	76
<i>Sekwencje regionu kontrolnego mtDNA łosi stanowiących próby muzealne</i>	79
<i>Sekwencje genu cytochromu b mtDNA</i>	80
<i>Drzewa filogenetyczne i sieci haplotypów</i>	81
<i>Datowanie zdarzeń ewolucyjnych</i>	85
<i>Rozkład liczby niedopasowań nukleotydowych (ang. mismatch distribution)</i>	86
Zmienność genetyczna populacji łosi w 11 loci mikrosatelitarnego DNA.....	87
Pokrewieństwo genetyczne.....	89
Izolacja przez dystans.....	90
Graficzna wizualizacja zróżnicowania między populacjami.....	90
Analiza wariacji molekularnej (AMOVA) i identyfikacja genetycznie odrębnych grup populacji.....	92
Przeływ genów między populacjami i identyfikacja migrantów.....	93
Sekwencje markerów zlokalizowanych na chromosomach Y i X.....	95
Sekwencje genu <i>MHC II DRB</i>	97
Charakterystyka reliktovej populacji łosi w dolinie Biebrzy – zestawienie najważniejszych wyników.....	99
<i>Subpopulacje łosi w basenie górnym, środkowym i dolnym doliny Biebrzy</i>	101
DYSKUSJA	104
Genealogiczna zgodność dowodem na głęboką filogeograficzną strukturę populacji.....	104
Charakterystyka linii filogenetycznych mtDNA u łosia.....	106
Zmienność genetyczna sekwencji mtDNA-cr u łosi w Polsce.....	115
Reliktowy charakter populacji łosi w dolinie Biebrzy.....	117
<i>Sekwencje mtDNA – reliktowy charakter populacji biebrzańskiej</i>	117
<i>Sekwencje markerów zlokalizowanych na chromosomie Y – reliktowy</i>	

<i>charakter populacji biebrzańskiej</i>	121
<i>Sekwencje genu MHC II DRB – reliktowy charakter populacji biebrzańskiej</i>	123
<i>Mikrosatelitarny DNA – reliktowy charakter populacji biebrzańskiej</i>	127
<i>Klasyfikacja rodzaju reliktu i identyfikacja jednostki zarządzania MU</i>	129
Źródła i kierunki powojennej ekspansji łośi w Polsce.....	130
Zróźnicowanie genetyczne między populacjami łośi w Polsce.....	133
<i>Zróźnicowanie genetyczne – mtDNA-cr</i>	133
<i>Zróźnicowanie genetyczne – loci mikrosatelitarnego DNA</i>	135
Podsumowanie.....	136
LITERATURA.....	138
TABELE.....	159
RYCINY.....	193

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi, dr hab. Mirosławowi Ratkiewiczowi, prof. UwB za umożliwienie mi realizacji pasjonujących badań terenowych i molekularnych w Zakładzie Zoologii Kręgowców. Dziękuję za ogromną cierpliwość i zaufanie, którymi obdarzał mnie w trakcie pisania niniejszej rozprawy, a dzięki którym ja sama byłam w stanie uwierzyć w swoje możliwości. Jestem wdzięczna za cenną krytykę oraz bezcenne wskazówki i rady merytoryczne, udzielane mi podczas pisania pracy.

Szczególne podziękowania dedykuję Magdzie Czajkowskiej i Norbertowi Dudzie. Dziękuję Wam za nieocenioną pomoc w terenie podczas zbierania prób oraz przy analizach laboratoryjnych. Wyjazdy w Polskę w poszukiwaniu prób losiowych z Wami były wspaniałą i niezapomnianą przygodą. Dziękuję również za Wasz optymizm i towarzystwo w chwilach oderwania się od pracy podczas „coffee breaks”.

Podziękowania kieruję również do kilku osób, od których wiele się nauczyłam i bez których ta praca byłaby znacznie uboższa. Anettcie Borkowskiej dziękuję za pomoc merytoryczną okazywaną mi podczas wszystkich lat mojej pracy. Maćkowi Matosiukowi jestem wdzięczna za pomoc przy izolacji DNA i przy okiełznaniu kilku, tylko z pozoru niewinnych, procedur statystycznych. Asi Supruniuk i Piotrkowi Rode za pomoc przy zbieraniu prób. Piotrkowi jestem szczególnie wdzięczna za wspaniałe, ekspresowo wykonane ryciny, zamieszczone w niniejszej rozprawie.

Liczne osoby uczestniczyły w zbieraniu materiału do analiz, dzięki czemu mogłam wykonać tak szczegółowe badania zmienności genetycznej u losia: Nadleśniczy Edward Komenda, Pracownicy Nadleśnictwa Knyszyn i Rajgród oraz wielu innych Nadleśnictw w Polsce, które odwiedziłam w trakcie zbierania prób, Pracownicy Biebrzańskiego Parku Narodowego, Kampinoskiego Parku Narodowego, w tym szczególnie Jan Danyłow i Edyta Owadowska-Cornil, Pracownicy Poleskiego Parku Narodowego, Iza i Piotr Talałaj oraz wielu niezwykle sympatycznych ludzi, którzy bezinteresownie udzielali swojej pomocy, a których nazwisk nigdy nie było mi dane nawet poznać.

Dziękuję Rodzicom, którzy zawsze we mnie wierzyli, wspierali i obdarzali ogromnym zaufaniem oraz Piotrkowi za Jego pogodę ducha i uśmiech.

Niniejsza praca była finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N304024134, projektu finansowanego ze środków Narodowego Funduszy Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej na zlecenie Ministra Środowiska 326/09/Wn50/NE-PR-Tx/D oraz grantu finansowanego z działalności statutowej (BMN).



UWAGI WSTĘPNE

Wybrane elementy uwzględniające zmienność genetyczną regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA (mtDNA-cr) u łośi w Polsce zostały wcześniej opublikowane. W pracy Świsłocka i wsp. (2008) przedstawiłam wyniki odnoszące się do zmienności w mtDNA-cr u 45 łośi: 39 osobników z doliny Biebrzy, 3 z Narwiańskiego Parku Narodowego oraz po jednym z Puszczy Knyszyńskiej, Piskiej i Kampinoskiego Parku Narodowego. Zidentyfikowałam cztery warianty mtDNA-cr: H1, który wystąpił tylko w populacji w dolinie Biebrzy oraz fińskie haplotypy H2, H3 i H4. Osobiście wykonałam analizy sekwencjonowania, opracowałam wyniki i pisałam wspólnie z promotorem maszynopis pracy.

W pracach Świsłocka i wsp. (2009, 2013b) oszacowałam różnicowanie genetyczne w mtDNA-cr między biebrzańską populacją łośi ($N = 39$), a sąsiadującą z nią populacją w Puszczy Augustowskiej ($N = 21$). Wartość różnicowania genetycznego Φ_{ST} (0,674) pozwoliła mi wnioskować, że nawet populacje łośi, które pozostają ze sobą w geograficznej łączności, mogą wykazywać silnie ograniczony przepływ genów w linii żeńskiej. W obu tych pracach, z których druga była popularno-naukowa, wykonałam samodzielnie analizy sekwencjonowania, pod opieką promotora opracowałam wyniki i pisałam maszynopisy.

Zmienność genetyczną w mtDNA-cr u 377 łośi pochodzących z siedmiu populacji: dolina Biebrzy, Puszcza Augustowska i Knyszyńska, Nadleśnictwo Srokowo, Kampinoski i Poleski Park Narodowy oraz Kompleks Gostynińsko-Włocławski opublikowałam w pracy Świsłocka i wsp. (2013a). W oparciu o 12 wariantów mtDNA-cr zidentyfikowanych w badanej próbie łośi połączonych z czterema haplotypami cytochromu *b* mtDNA skonstruowałam drzewo powiązań filogenetycznych u łośi w Polsce. W obrębie haplogrupy Europejskiej łośi zidentyfikowałam kład Centralna Europa oraz jego trzy gałęzie: Biebrza, Polesie i Fennoscandia. W pracy tej opublikowałam również zmienność u samców łośi w odcinku *DBY14* zlokalizowanym na chromosomie Y, w którym wykryłam cztery warianty genetyczne tego genu. W tym przypadku również samodzielnie wykonałam wszystkie analizy z zakresy biologii molekularnej, opracowałam wyniki oraz pod opieką promotora pisałam maszynopis.

Dane uzyskane z analiz mtDNA-cr w pozostałych, uwzględnionych w niniejszej rozprawie populacjach łośi w Polsce nie zostały jeszcze opublikowane, podobnie jak zmienność genu *MHC II DRB* oraz w 11 loci mikrosatelitarnego DNA.

STRESZCZENIE

Magdalena Świsłocka: „Struktura genetyczna populacji łośia (*Alces alces*) w dolinie Biebrzy”

Naturalny zasięg i rozmieszczenie współcześnie żyjących populacji roślin i zwierząt, zamieszkujących północne i umiarkowane obszary Europy, zostały ukształtowane przede wszystkim przez oscylacje klimatu i związane z nimi zmiany w środowisku, które miały miejsce w czwartorzędzie. Jedną z ważniejszych konsekwencji zmian zasięgów różnych gatunków jest występowanie populacji reliktowych, interpretowanych jako ślad z przeszłości, czy wręcz jako „żywy” zapis w postaci potomków osobników, którym udało się przetrwać pewien niekorzystny okres. Relikty stanowią wyraźnie odrębne od pozostałych populacje lub gatunki, charakteryzujące się małą liczebnością i/lub silnie ograniczonym zasięgiem geograficznym. Populacje takie stanowią ważny komponent zmienności wewnątrzgatunkowej i mogą determinować potencjał ewolucyjny jednostki taksonomicznej, w skład której wchodzi. Aby w jednoznaczny sposób zidentyfikować ich pochodzenie i rodzaj reliktu, jaki stanowią, wymagane jest przeprowadzenie badań z wykorzystaniem markerów genetycznych o różnym sposobie dziedziczenia.

Gębczyńska i Raczyński (2004) sugerowali, że biebrzańska populacja łośi, która zasiedliła obszar doliny Biebrzy najprawdopodobniej po ostatnim zlodowaceniu, jest autochtoniczna i może stanowić najdalej na zachód Europy wysunięty reliktdawnego, naturalnego zasięgu tego gatunku. Populacja ta doświadczyła serii licznych, znaczących redukcji liczebności w czasach historycznych i była w istotnym stopniu izolowana od innych, europejskich populacji tego gatunku. W związku z tym, jako główny cel moich badań obrałam określenie struktury genetycznej unikalnej w skali Europy Środkowej populacji łośi w dolinie Biebrzy za pomocą różnych klas markerów molekularnych, podlegających swoistym im zasadom dziedziczenia: sekwencje mitochondrialnego DNA (region kontrolny, *mtDNA-cr* i cytochrom b, *cytb*) dziedziczonego w linii matczynej, sekwencje *YCATS* wraz z genem *SRY* zlokalizowane na chromosomie Y, które dziedziczone są w linii ojcowskiej, a także potencjalnie podlegające doborowi sekwencje

genu *MHC II DRB* oraz neutralne loci mikrosatelitarnego DNA, dziedziczone po obojgu rodzicach. W analizach uwzględniłam 155 łośi pochodzących z doliny Biebrzy, 433 osobniki z pozostałego obszaru występowania gatunku w Polsce, 15 osobników z Litwy oraz 9 z Niemiec.

W próbie z Polski zidentyfikowałam 12 haplotypów mtDNA u łośi, w tym siedem nowych w skali Europy, co podkreśla rolę Polski jako bardzo ważnego obszaru zmienności tego gatunku. Zidentyfikowane warianty genetyczne mtDNA-cr u łośi reprezentują kład Ural (haplotypy „fińskie” H2, H3 i H4) oraz Centralna Europa, w obrębie którego tworzą trzy gałęzie: Biebrza (H1, H10, H13), Polesie (H12 i H20) i Fennoscandia (H6, H11, H17 i H22). Obecność w Polsce łośi wywodzących się z kilku linii ewolucyjnych, które szczyt ostatniego zlodowacenia przetrwały w różnych refugiach glacialnych, jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za wysoki poziom zmienności genetycznej łośia na terenie naszego kraju. Między poszczególnymi liniami filogenetycznymi łośi wytworzyła się wtórna strefa kontaktu, zlokalizowana w Polsce północno-wschodniej. Ważną rolę w kształtowaniu obserwowanego wzoru zmienności u łośia odegrały również kierunek kolonizacji Polski i ekspansja przestrzenna, które przebiegały ze wschodu na zachód. Z kolei, czynnik ludzki jest odpowiedzialny za występowanie w Polsce łośi posiadających haplotyp mtDNA-cr H6, reprezentujący typowy wariant dla łośi szwedzkich oraz haplotyp H11, stanowiący ślad po udanej reintrodukcji łośi z Białorusi w 1951 roku.

W populacji łośi w dolinie Biebrzy stwierdziłam u większości osobników (81%) obecność unikalnego haplotypu H1, reprezentującego jeden z bardziej zróżnicowanych europejskich wariantów genetycznych mtDNA-cr. Haplotyp H1 razem z haplotypami H10 i H13 oraz haplotypem H18, zidentyfikowanym wyłącznie w materiale muzealnym, tworzy na drzewie filogenetycznym w obrębie kładu Centralna Europa gałąź Biebrza. Stanowi on dowód, że populacja łośi, która tam występuje i zapewne zasiedliła obszar doliny Biebrzy po ustąpieniu ostatniego zlodowacenia jest autochtoniczna. Osobniki posiadające haplotypy należące do gałęzi Biebrza różnicowały się od pozostałych łośi europejskich reprezentujących gałęzie Polesie i Fennoscandia przed ostatnim zlodowaceniem. U samców w populacji biebrzańskiej występują dwa warianty genetyczne odcinka *DBY14* zlokalizowanego na chromosomie Y. Obok haplotypu H1-*DBY14*, reprezentującego wariant tego genu najczęściej stwierdzany u łośi, zidentyfikowałam również haplotyp H2-*DBY14*, który z wyjątkiem populacji reintrodukowanej w Kampinoskim Parku

Narodowym, w pozostałych współczesnych populacjach łośi z Polski nie został odnaleziony. Haplotyp H2-*DBY14* może być kolejnym śladem pozostawionym przez samce wywodzące się z autochtonicznej populacji łośi w dolinie Biebrzy, która skolonizowała ten obszar po ustąpieniu ostatniego zlodowacenia. W populacji biebrzańskiej zidentyfikowałam największą liczbę alleli ($N = 8$) w genie *MHC II DRB*, spośród których allel *DRB1*11* jest unikalny dla tej populacji i poza nią nie został nigdzie stwierdzony. Różnice we frekwencji alleli genu *MHC II DRB* między populacjami łośi w Polsce mogą podlegać wpływowi doboru równoważącego, faworyzującego heterozygoty i utrzymującego różnorodność alleli. Reliktowy charakter populacji biebrzańskiej potwierdzają także analizy mikrosatelitarnego DNA, które wykazały, że populacja ta wyróżnia się posiadaniem unikalnych alleli, jak również najwyższą średnią liczbą alleli w poszczególnych loci. Między populacjami łośi zlokalizowanymi w Polsce północno-wschodniej zidentyfikowałam silnie ograniczony przepływ genów w przypadku samic. Reliktowa populacja biebrzańska wydaje się pozostawać w izolacji w stosunku do pozostałych analizowanych populacji łośi, z wyjątkiem kilku populacji „mazurskich”, w których udział osobników posiadających haplotyp mtDNA-cr H1, a więc o pochodzeniu „biebrzańskim”, jest dominujący.

Na podstawie powyższych wyników badań genetycznych, reliktowa populacja łośi w dolinie Biebrzy powinna zostać wyróżniona jako specjalna jednostka zarządzania, która zachowała swoją odrębność genetyczną i jest w znacznym stopniu izolowana, a przez co demograficznie niezależna od innych populacji. Populacja ta w skali europejskiego zasięgu łośia wyróżnia się relatywnie niedużą liczebnością, ograniczonym zasięgiem geograficznym, które stanowią cechy właściwe populacjom reliktowym.

WSTĘP

Refugia glacialne, postglacialna kolonizacja Europy Centralnej i Północnej

Obserwowane współcześnie rozmieszczenie różnorodności gatunków, jak i genetycznej zmienności wewnątrzgatunkowej, nie może być w pełni zrozumiane bez poznania istoty procesów, jakie zachodziły w populacjach w odpowiedzi na zmiany geologiczne i klimatyczne towarzyszące historii Ziemi (Rowe i wsp. 2004). Przede wszystkim przekształcenia w środowisku i oscylacje klimatu, które wystąpiły w czwartorzędzie, miały zasadniczy wpływ na wytworzenie się naturalnego zasięgu i rozmieszczenie współcześnie żyjących populacji roślin i zwierząt zamieszkujących północne i umiarkowane obszary Europy (Hewitt 1993, 2000; Taberlet i wsp. 1998; Culling i wsp. 2006; Alexandri i wsp. 2012). Plejstocenijskie zlodowacenia przerywane okresami ocieplenia niewątpliwie odegrały główną rolę w formowaniu się w izolacji odrębnych (zróżnicowanych) linii genetycznych, rozmieszczonych w zasięgach geograficznych wielu gatunków (Hewitt 2000). W trakcie późnego czwartorzędzkiego wystąpiły dwa główne szczyty zlodowacenia, z których pierwszy (ang. *maximum glacial cooling*) miał miejsce 74 000 – 60 000 lat temu, natomiast drugi, tzw. szczyt ostatniego zlodowacenia (ang. *Last Glacial Maximum*, LGM) rozpoczął się około 25 000 lat temu i zakończył blisko 18 000 lat temu (Sommer i Zachos 2009). Ostatnie zlodowacenie było najzimniejszym okresem od czasów środkowego plejstocenu, w efekcie czego, występowanie i zasięg gatunków umiarkowanych były wówczas znacznie ograniczone. Z uwagi na fakt, że kurczenie się zasięgu często prowadzi do sortowania linii ewolucyjnych, czyli utrwalania różnych wariantów w poszczególnych refugiach, jedynie niewielka część wcześniej występującej zmienności genetycznej była reprezentowana w refugiach z okresu LGM i dostępna jako podstawa do procesu późniejszej rekolonizacji (Sommer i Zachos 2009). Scenariusz ten potwierdzają między innymi analizy mitochondrialnego DNA, zgodnie z którymi np. Zachodnia i Wschodnia linia niedźwiedzia brunatnego (*Ursus arctos*) są współcześnie wyraźnie od siebie oddzielone geograficznie, z wyjątkiem Rumunii (Zachos i wsp. 2008; Davison i wsp. 2011; Keis i wsp. 2013), jakkolwiek analizy genetyczne kopalnego DNA (ang. *ancient DNA*) pokazują, że

Wschodnia linia niedźwiedzi występowała przed LGM daleko na zachód, sięgając Półwyspu Iberyjskiego (Valdiosera i wsp. 2008).

Jedną z powszechnie akceptowanych hipotez jest założenie, że europejskie gatunki roślin i zwierząt ze strefy umiarkowanej w trakcie okresów zlodowacenia, które swym zasięgiem obejmowały znaczną część Europy Północnej, wycofywały się na tereny położone w niższych szerokościach geograficznych. W efekcie tych procesów, w szczytowym okresie ostatniego zlodowacenia istniały na południu Europy istotne dla przeżycia gatunków izolowane obszary, tzw. refugia glacialne, mianowicie Półwysep Iberyjski i Apeniński oraz Bałkany wraz z regionami wokół Morza Czarnego (Teberlet i wsp. 1998; Hewitt 1999, 2000; Weiss i Ferrand 2007). W takich refugiach istniały dogodne warunki do utrzymania stabilnych populacji, które były też swoistym rezerwuarem zmienności genetycznej (Petit i wsp. 2003). Przeżycie danego gatunku w kilku różnych refugiach glacialnych miało istotny wpływ na rozmieszczenie wewnątrzgatunkowych linii ewolucyjnych i może być wyjaśnione poprzez analizę obserwowanego rozmieszczenia poszczególnych haplotypów charakterystycznych dla danego regionu (Sommer i Nadachowski 2006). Zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Schmitta (2007) gatunki, które skolonizowały Europę z tych trzech półwyspów południowych, należą do tzw. grupy śródziemnomorskiej.

Porównanie składu fauny z okresu szczytu ostatniego zlodowacenia w Europie Południowej wykazało, że wyraźnie dominowały wówczas trzy dobrze znane gatunki ssaków preferujących klimat umiarkowany, mianowicie jelen szlachetny (*Cervus elaphus*), sarna europejska (*Capreolus capreolus*) oraz lis pospolity (*Vulpes vulpes*), które w blisko 40% analizowanych z tego okresu stanowisk występowały razem (Sommer i Nadachowski 2006). Zdecydowanie najczęściej stwierdzany był jelen szlachetny, odkryty w 80% miejsc, drugi co do częstości był lis, który z kolei okazał się bardzo rzadkim gatunkiem w refugium Bałkańskim. W tradycyjnych refugiach glacialnych zlokalizowanych na południu Europy skład fauny z miejsc datowanych na LGM wskazuje na regularne występowanie typowych w tamtym okresie elementów fauny, takich jak mamut (*Mammuthus primigenius*) i renifer (*Rangifer tarandus*). Mniej reprezentowane w tym okresie były inne duże ssaki roślinożerne, takie jak łoś (*Alces alces*) i tur (*Bos primigenius*; Sommer i Nadachowski 2006).

Nowsze analizy genetyczne wykazały jednak, że obok wymienionych wcześniej tradycyjnych refugium glacialnych na południu Europy, w trakcie LGM istniały także refugia, które zlokalizowane były w Europie Centralnej, mianowicie w Karpatach, w południowo-zachodniej Francji, jak również w Europie Wschodniej i/lub Azji, między innymi w Syberii czy Mandżurii (Fedorov i wsp. 2008; Sommer i Zachos 2009). We Francji Południowej i w Karpatach oraz w Basenie Karpackim w dolinie środkowego Dunaju istniały refugia jelenia szlachetnego, łośia i sarny europejskiej (Sommer i Zachos 2009), a także między innymi żmii zygzakowatej (*Vipera berus*; Ursenbacher i wsp. 2006), żaby moczarowej (*Rana arvalis*; Babik i wsp. 2004) czy też łasicy łąski (*Mustela nivalis*; McDevitt i wsp. 2012). Refugia te związane były także z określonymi gatunkami flory, czego przykładem może być świerk norweski (*Picea obovata*), drzewo występujące w klimacie borealnym, które nie przetrwało czwartorzędowych glacjałów w południowych regionach Europy, ale odpowiednio w Alpach Dynarskich, Karpatach i na obszarze dzisiejszej Moskwy (Huntley i Birks 1983; Lagercrantz i Ryman 1990). Potencjalne przeżycie niekorzystnych warunków klimatycznych w ostojach glacialnych zlokalizowanych w Europie Centralnej, a więc na północ od tzw. refugium „południowych”, tj. śródziemnomorskich, wpłynęło na rozmieszczenie na nowo skolonizowanych terenach dominujących haplotypów wywodzących się z poszczególnych refugium (Sommer i Nadachowski 2006). Istnienie tych refugium znacząco bowiem redukowało czas, w którym po szczycie ostatniego zlodowacenia gatunki dokonywały ponownej kolonizacji strefy chłodniejszej w Europie Północnej (Sommer i Nadachowski 2006).

W przypadku małych ssaków, takich jak nornik północny (*Microtus oeconomus*), tolerujących warunki klimatyczne obecne podczas LGM, refugia glacialne mogły istnieć daleko na północy Eurazji, m. in. na wyspie Andrya zlokalizowanej poza Norwegią Północną (Brunhoff i wsp. 2006; Nève i Verlaque 2010). Ograniczona jednak dostępność danych powoduje, że refugia w Europie Wschodniej i/lub Azji mogą być dziś niedoceniane (Taberlet i wsp. 1998; Sommer i Nadachowski 2006; Provan i Bennett 2008).

W trakcie postglacialnego ocieplenia w Europie, niektóre z linii ewolucyjnych (kładów), które przetrwały w refugiach glacialnych, rozszerzały swój zasięg poprzez kolonizację centralnych i północnych rejonów kontynentu, będącą konsekwencją ekspansji korzystnych dla życia środowisk (ang. *habitat tracking*, Provan i Bennett 2008)

i kształtując obecne interglacjalne rozmieszczenie gatunków (Hewitt 2011a). Kolonizacja z refugium „południowych” do Europy Północnej była procesem dosyć szybkim, niektóre gatunki drzew pokonywały ponad 1 km w ciągu roku (Hewitt 2001).

Jak wykazały badania z zakresu filogeografii, lokalizacja i kierunki tras postglacjalnej kolonizacji Europy Centralnej i Północnej z refugium położonych na południu, w przypadku większości gatunków roślin i zwierząt, mimo różnic związanych z zajmowanymi przez nie siedliskami, czy ich mobilnością, wykazują interesującą zbieżność (Hewitt 1999, 2004; Habel i wsp. 2005; Schmitt 2007). Te paradygmaty, znane jako paradygmat konika polnego (*Chorthippus parallelus*), niedźwiedzia brunatnego, jeża (*Erinaceus europaeus/concolor*), klenia (*Leuciscus cephalus*) i polowca szachownicy (*Melanargia galatea*), stanowią dobre przykłady wzorów kolonizacji dla wielu gatunków roślin i zwierząt (Hewitt 2011a). Paradygmat jeża został odnaleziony między innymi u dębu (*Quercus* ssp.; Dumolin-Lapègue i wsp. 1997), jodły pospolitej (*Abies alba*; Konnert i Bergmann 1995) i myszy domowej (*Mus musculus*; Boursot i wsp. 1993), a z kolei paradygmat niedźwiedzia brunatnego u ryjówki aksamitnej (*Sorex araneus*; Taberlet i wsp. 1994; Fumagalli i wsp. 1996) czy też karczownika (*Arvicola terrestris*; Taberlet i wsp. 1998).

Głównym źródłem postglacjalnej rekolonizacji Europy było refugium Bałkańskie, nieco mniejsze znaczenie odegrało refugium Iberyjskie, podczas gdy linie ewolucyjne występujące na Półwyspie Apenińskim były często izolowane z uwagi na obecność bariery, jaką stanowiły Alpy (Taberlet i wsp. 1998; Hewitt 2004, 2011a). Interesującym efektem istnienia różnych tras rekolonizacji postglacjalnych obszarów Europy jest skład fauny i flory, między innymi Skandynawii czy też obszaru Pacyfiku północno-zachodniego w Ameryce Północnej, które reprezentują mieszaninę gatunków pochodzących z różnych refugium glacialnych. Konik polny występujący w Skandynawii Centralnej przywędrował z refugium Bałkańskiego, niedźwiedź brunatny z okolic Kaukazu i Półwyspu Iberyjskiego, a klen z obszaru Morza Czarnego (Hewitt 2004, 2011a). Jakkolwiek w procesie rekolonizacji Europy przeważały kierunki wiodące z trzech półwyspów południowych, to nie u wszystkich gatunków odgrywały one tak istotną rolę. W przypadku sarny europejskiej bardziej prawdopodobną hipotezą jest, że jeden lub kilka dodatkowych refugium zlokalizowanych na wschodzie wyjaśniają najlepiej obserwowaną obecnie zmienność genetyczną tego gatunku (Sommer i Zachos 2009).

Konsekwencje genetyczne postglacjalnej ekspansji zasięgu gatunków

Modele rekolonizacji 'Phalanx' i 'Pioneer' (sensu Nichols i Hewitt 1994)

W bardzo wielu przypadkach tylko niewielka część obecnej w refugiach glacialnych zmienności genetycznej jest dziś stwierdzana w populacjach zamieszkujących rejon postglacjalne. Istnienie relatywnie mniejszej zmienności genetycznej wśród populacji z Europy Centralnej i Północnej w porównaniu do populacji występujących na południu, określane jest jako paradygmat *'southern richness versus northern purity'* (Hewitt 2000, 2011b). Ten gradient zmienności genetycznej występujący na osi południe – północ, obserwowany na półkuli północnej, interpretowany jest jako odzwierciedlenie szybko zachodzących zdarzeń kolonizacji następujących po LGM (Hewitt 1996, 2000; Waters i wsp. 2013). W przypadku populacji człowieka, zmienność genetyczna spada istotnie liniowo wraz ze wzrostem dystansu geograficznego od Afryki, co jest dowodem na migracje ludzi właśnie z Afryki (Ramachandran i wsp. 2005; Pala 2012). Wzory „homogenności” w populacjach zajmujących wyższe szerokości geograficzne zostały znalezione również w populacjach występujących na półkuli południowej (Ruzzante i wsp. 2008; Nikula i wsp. 2010).

Ściśle określony wzór rekolonizacji zależy w głównej mierze od skali zmian klimatycznych, topografii terenu oraz zdolności do rozmnażania się i dyspersji gatunków. Rekolonizacja obszarów postglacjalnych mogła dokonywać się zgodnie z modelem *'Phalanx'* (Nichols i Hewitt 1994), oznaczającym powolną ekspansję, pociągającą za sobą dyspersję na krótkie odcinki i charakteryzującą się dużą efektywną wielkością populacji, w efekcie czego, na rekolonizowanym obszarze, obejmującym najczęściej dzisiejsze tropiki oraz masywy górskie znajdujące się na południu strefy umiarkowanej, dochodziło do zachowania zmienności genetycznej (Hewitt 2001). Z drugiej strony, rekolonizacja mogła zachodzić według scenariusza *'Pioneer'* (Nichols i Hewitt 1994), w który zaangażowana była mniejsza liczba osobników, pochodzących z czoła refugialnego zasięgu gatunku (ang. *leading edge*), dokonująca szybkiej kolonizacji obszarów wysuniętych daleko na północ od refugium glacialnego (ang. *leptokurtic dispersal*). Pionierzy tacy są w stanie szybko wypełnić i zająć obszar przed przybyciem osobników z zasadniczego obszaru zasięgu, wskutek czego to ich geny będą dominowały w nowo

założonej populacji (Hallatschek i Nelson 2009). Jednak proces szybkiej kolonizacji, któremu towarzyszą efekty założyciela, prowadzi do spadku różnorodności haplotypowej i bogactwa allelicznego na zajmowanych terenach, a w końcowym efekcie, do wzrostu homozygotyczności w populacjach (Nève i Verlaque 2010; Hewitt 2011a, b). Z kolei populacje znajdujące się na południu (ang. *trailing edge*), a często także w centrum zasięgu refugialnego, mogą nie być zdolne do zasilenia kolonizowanego obszaru swoimi genami i w efekcie będą zmuszone do przeżycia w tym miejscu, w którym się znalazły, ewentualnie do rozszerzenia swego zasięgu przez pokonanie barier geograficznych, najczęściej gór (Hewitt 1999; Alexandri i wsp. 2012). Populacje takie pozostają więc odizolowane od ciągłego zasięgu gatunku, mogą być zróżnicowane genetycznie i podlegać odmiennej presji selekcyjnej.

Wtórne strefy kontaktu w Europie

W przypadku, gdy postglacjalna rekolonizacja odbywała się z kilku miejsc jednocześnie, populacje pochodzące z odrębnych refugium glacialnych spotykały się ze sobą, doprowadzając do powstania wtórnych stref kontaktu (Hewitt 1999; Habel i wsp. 2010a). Takie wąskie strefy rozdzielają genomy wielu gatunków wzdłuż ich zasięgu, doprowadzając do wyodrębnienia się podgatunków, ras, linii filogenetycznych, czy też lokalnych odmian i form. Wtórne strefy kontaktu mogą być identyfikowane za pomocą czułych markerów molekularnych, między innymi mtDNA, jak i mikrosatelitarnego DNA (Hewitt 1988, 1993). W Europie wyróżnionych zostało pięć regionów, tak zwanych ‘*suture zone*’, w których stwierdzona została wysoka liczba stref kontaktu, mianowicie Alpy, Pireneje, zachodnia Europa Centralna, wschodnia Europa Centralna oraz Skandynawia Centralna (Taberlet i wsp. 1998; Hewitt 2004; Schmitt 2007). Różnorodność genetyczna w takich strefach, wskutek obecności w populacjach odmiennych alleli i haplotypów należących do różnych linii refugialnych, jest wysoka (Provan i Bennett 2008; Nève i Verlaque 2010). Zdarza się, że wąskie strefy hybrydowe pełnią rolę barier zapobiegających dalszej ekspansji linii ewolucyjnych wywodzących się z różnych refugium glacialnych. Najczęściej dobór skierowany jest przeciwko hybrydom, w efekcie czego następuje obniżenie ich dostosowania (Hewitt 1996). Fakt ten determinuje szerokość stref hybrydowych oraz ich trwałość, jako barier zapobiegających przepływowi genów.

Strefy hybrydowe mogą także pełnić rolę „pułapek środowiskowych” występujących w skali lokalnej i utrzymywać się do czasu pojawienia się istotnych zmian w klimacie i środowisku. W efekcie utrzymywania się takich stref mogą istnieć trwale i stabilne oraz efektywnie izolowane, sąsiadujące ze sobą rasy/podgatunki/populacje. Przykładowo strefa hybrydowa stwierdzona u wielu gatunków w Pirenejach stanowi efektywną barierę dla przepływu genów między francuskimi i hiszpańskimi genomami od czasu jej uformowania, blisko 9 000 lat temu (Hewitt 1993). Strefy kontaktu chronią więc integralność dwóch genomów.

Surfing genetyczny

Przestrzenna ekspansja na nowo kolonizowanych terenach może prowadzić do rozprzestrzeniania się rzadkich alleli na dużym obszarze, co w efekcie pozwala im osiągnąć bardzo wysoką frekwencję (Edmonds i wsp. 2004; Klopstein i wsp. 2006). Ten fenomen uznany za ‘*surfing*’ (Klopstein i wsp. 2006) jest spowodowany przez dryf genetyczny połączony z powtarzającymi się efektami założyciela w populacjach zlokalizowanych na obrzeżu ekspansji. Allele o niskiej frekwencji mogą „surfować” na fali frontu rozszerzającej się populacji, wskutek czego jeden allel lub genotyp mają szansę stać się dominującymi w lokalnym terenie (Waters i wsp. 2013). W konsekwencji prowadzi to do potencjalnie dużych różnic we frekwencji alleli między regionami geograficznymi i często, choć błędnie, interpretowane jest jako cecha charakterystyczna pozytywnej selekcji (Evans i wsp. 2005; Soranzo i wsp. 2005; Xue i wsp. 2006). W ostatnim czasie skutki występowania zjawiska *surfingu* genetycznego są coraz lepiej rozumiane (Waters i wsp. 2013). Nowa mutacja, do powstania której dochodzi na froncie fali ekspansji, ma zdecydowanie większe szanse „surfować”, niż mutacje występujące w całym zajmowanym przez populację obszarze. Bardzo często rozprzestrzenienie geograficzne takich nowych alleli może być w znacznej odległości od miejsca ich powstania (Edmonds i wsp. 2004; Travis i wsp. 2007). Dodatkowo, *surfing* faworyzowany jest w małych populacjach przechodzących ekspansję demograficzną i przestrzenną, które utrzymują ograniczony przepływ genów z populacjami sąsiadującymi. Hallatschek i wsp. (2007) wykazali, że *surfing* może w znaczący sposób modyfikować neutralną zmienność genetyczną dużych populacji naturalnych. Fenomen *surfingu* wcześniej wykorzystywany był jedynie do

opisania losu pojedynczych mutacji (Edmonds i wsp. 2004; Klopstein i wsp. 2006; Travis i wsp. 2007). Mutacje szkodliwe mogą „surfować” równie dobrze, aczkolwiek nie tak często jak mutacje neutralne i korzystne. Interesujące okazuje się, że większość mutacji szkodliwych, które są w stanie się utrzymać, mogą „surfować” przez dłuższe dystanse, osiągając przy tym wysokie frekwencje (Travis i wsp. 2007). Prawdopodobieństwo wystąpienia *surfingu* powinno być wprost proporcjonalne do początkowej częstości allelu w miejscu jego występowania na czole fali ekspansji, a frekwencja ta z kolei powinna określać docelowy obszar, na którym „surfujący” allel osiągnie wysokie częstości występowania po zakończeniu ekspansji zasięgu (Edmonds i wsp. 2004; Klopstein i wsp. 2006; Hallatschek i wsp. 2007; Hallatschek i Nelson 2008; Excoffier i Ray 2008).

Populacje reliktowe

Istnienie populacji reliktowych jest ważnym komponentem wewnątrzgatunkowej bioróżnorodności oraz wyznacznikiem potencjału ewolucyjnego gatunku. Najczęściej wskutek izolacji i małej efektywnej wielkości populacji, zmienność genetyczna jest w nich zredukowana. Aby w jednoznaczny sposób zdefiniować populacje reliktowe, należy przeprowadzić badania z wykorzystaniem markerów genetycznych o różnym stopniu dziedziczenia (Hofreiter i wsp. 2004).

Populacje reliktowe (łac. *relinquere*, to znaczy „pozostawiać za sobą”) interpretowane są zazwyczaj jako ślad pochodzący z przeszłości, czy wręcz jako potomkowie osobników, którym udało się przetrwać pewien niekorzystny okres. Tworzą je zazwyczaj wyraźnie odróżniające się od pozostałych populacje lub gatunki, które charakteryzują się małą liczebnością lub silnie ograniczonym zasięgiem geograficznym (Habel i wsp. 2010b). Bardzo często populacje reliktowe występują na skraju zasięgu gatunku, gdzie panujące warunki mogą nie być tak optymalne, jak w centrum występowania (Gullberg i wsp. 1998). Joger i wsp. (2010) definiują populacje reliktowe, jako części linii ewolucyjnych, które były i nadal są izolowane geograficznie od reszty zasięgu gatunku.

Wśród reliktyw wyróżniamy relikty filogenetyczne (taksonomiczne), będące formą archaiczną nadal istniejącą, podczas gdy inni członkowie wyższego taksonu, do którego należy relikty wyginęli, tak jak jest to w przypadku hatterii (*Sphenodon*) z Nowej Zelandii

(Habel i wsp. 2010b). Innym rodzajem są relikty biogeograficzne, nazywane relikdami właściwymi, które reprezentują takson występujący w danym regionie, znajdujący się w izolacji od swojego głównego centrum rozmieszczenia i którego obecne występowanie tłumaczy się pozostawieniem jego lub jego przodka w odmiennych warunkach naturalnych, niż dziś istniejące (Lomolino i wsp. 2006). Obie kategorie reliktdów czasami pokrywają się, jak to jest w przypadku żywych skamieniałości, między innymi ryb trzonopłetwych i dwudysznych czy też torbaczy (Lomolino i wsp. 2006; Beierkuhnlein 2007). Wśród reliktdów właściwych wyróżniamy relikty klimatyczne, obejmujące taksony, których zasięg na określonym obszarze został zredukowany na skutek niekorzystnych dla nich zmian klimatycznych, relikty topograficzne, związane ze starymi elementami rzeźby terenu, które zanikają obecnie w toku procesów geomorfologicznych, między innymi jodła pospolita na europejskim dziale wodnym w Puszczy Białowieskiej oraz relikty edaficzne związane z określonym typem gleb, które kiedyś były szerzej rozprzestrzenione, a obecnie utrzymują się tylko w niewielu miejscach, np. słonorośla i rośliny wydmowe w głębi łądu. Do reliktdów klimatycznych zaliczamy z kolei relikty glacialne, obecnie szeroko rozpowszechnione w Europie Północnej, obejmujące gatunki borealne, arktyczne i górskie oraz relikty interglacialne, stanowiące pozostałość pewnych okresów ocieplenia, kiedy to gatunki termofilne były szeroko rozpowszechnione, ale wskutek spadku temperatury i wzrostu ilości opadów zostały odizolowane i ograniczone występowaniem wyłącznie do środowisk dla nich korzystnych (Cox i Moore 2010; Habel i wsp. 2010b; Zimmermann i wsp. 2010). Pochodzenie i rozmieszczenie współcześnie żyjących reliktdów biogeograficznych może być związane ze zmianami środowiskowymi, które miały miejsce w przeszłości.

Innym podejściem, zaproponowanym przez Zimmermanna i wsp. (2010), jest wyróżnienie reliktdów geograficznych, genetycznych i reliktdów obejmujących taksony endemiczne. Relikty geograficzne, takie jak np. niewielkie populacje zaskrońca rybołowa (*Natrix tessellate*) i węża eskulapa (*Zamenis longissimus*) w Czechach, Polsce w okolicach Cieszyna, czy też w Niemczech, zajmują obszary geograficznie ograniczone, w których występują korzystne warunki środowiskowe i klimatyczne. Wspomniane wyżej gatunki osiągnęły zajmowane obecnie terytorium w okresie postglacialnym i sklasyfikowane zostały jako holocenijskie populacje reliktdowe (Cassel-Lundhagen 2010). Z kolei relikty genetyczne, stwierdzane zazwyczaj na południowym lub wschodnim krańcu zasięgu

gatunku w Europie, posiadają wyjątkowe, wyraźnie odrębne haplotypy lub też grupy haplotypów. Ważnym kryterium przy ich wyznaczaniu jest również redukcja zasięgu występowania. Relikty takie zazwyczaj wyróżniają się długą historią ewolucyjną w jednym szczególnym regionie i nie były zdolne do rozszerzania swojego postglacjalnego zasięgu. Są zdecydowanie starsze w porównaniu z relikdami holoceniowymi i klasyfikowane jako plejstoceniowe populacje reliktowe (Cassel-Lundhagen 2010; Zimmermann i wsp. 2010).

Hampe i Petit (2005) postulują, że przekonanie o znajdowaniu się populacji reliktowych na nieuchronnej drodze do wyginięcia, może być błędne. Istnieją przecież populacje reliktowe, które niewątpliwie zachowują potencjał, pozwalający im przystosować się do szerokiego spektrum warunków środowiskowych, w efekcie czego wciąż trwają, pomimo upływu czasu. Zarówno rzadkość występowania oraz ograniczone rozprzestrzenienie powodują, że populacje reliktowe są szczególnie narażone na wyginięcie, zwłaszcza w konfrontacji z postępującymi zmianami klimatycznymi i innymi zaburzeniami ekologicznymi (Habel i wsp. 2010b). Populacje i gatunki reliktowe są doskonałym obiektem badań ekologicznych i ewolucyjnych (Lesica i Allendorf 1995). W szczególności badania filogeograficzne mogą dać wgląd w procesy historyczne, ekologiczne i ewolucyjne, w tym w kontekście przeszłych przemieszczeń w rozmieszczeniu gatunków (Avice 2000; Hewitt 2000, 2004; Schmitt 2007). Ponadto, analizy filogeograficzne i populacyjne pozwalają identyfikować populacje reliktowe o specjalnym znaczeniu dla ochrony i zarządzania (Moritz 1994; Pérez-Tris i wsp. 2004; De Guia i Saitoh 2007). Wiele gatunków reliktowych jest obecnie zagrożonych wyginięciem i w efekcie umieszczone zostały w Czerwonych Księgach Roślin i Zwierząt. Jako, że są one zasadniczym składnikiem ogólnej bioróżnorodności, ich ochrona powinna być jednym z priorytetów w ochronie przyrody (Habel i wsp. 2010b; Zimmermann i wsp. 2010).

Ewolucyjnie ważne jednostki i jednostki zarządzania

Izolowane populacje wskutek dywergencji mogą w dłuższej skali czasu stać się jednostkami ważnymi z punktu widzenia procesów ewolucyjnych (ang. *evolutionary significant units*, ESU; Moritz 1994, 1995). Jednostki te, w znacznym stopniu odrębne od

innych takich jednostek, stanowi jedna lub więcej populacji charakteryzujących się unikalną, odrębną od reszty historią ewolucyjną. ESU są więc głównym źródłem historycznej, a być może również adaptacyjnej różnorodności genetycznej w obrębie gatunku (Fraser i Bernatchez 2001) i jako takie zasługują na szczególną uwagę w kontekście działań ochronnych (Avisé 2000, 2008). Wiele populacji reliktowych, pozostających w izolacji od pozostałych populacji gatunku, klasyfikowanych jest jako potencjalni kandydaci do uznania ich za ESU (Zimmermann i wsp. 2010). Zgodnie z założeniami przedstawionymi w tekście poniżej, ESU uznaje, że populacje takie są na drodze do przekształcenia się w odrębną jednostkę ewolucyjną, co prowadzi do nadania im odmiennego statusu taksonomicznego (Moritz 1994).

W rzeczywistości ESU nawiązują do „wewnątrzgatunkowych grup filogeograficznych” zdefiniowanych przez Avisé’a i Walkera (1999). Praktyczne kryteria wyznaczania ESU w oparciu o dane genetyczne zaproponowane przez różnych autorów różnią się znacznie między sobą. Jedno z ogólnych podejść identyfikujących ESU bierze pod uwagę ich istotny udział w ogólnej różnorodności genetycznej gatunku, uznając za ESU populacje, które nie wymieniają genów z innymi populacjami i charakteryzują się posiadaniem wyjątkowych lub znacznie różniących się od pozostałych populacji adaptacji (Waples 1991). Bardziej szczegółowa definicja uwzględnia utrwalone różnice genetyczne w mitochondrialnym DNA między populacjami danego gatunku, które są jednocześnie monofiletyczne pod względem sekwencji mtDNA oraz różnią się istotnie częstościami alleli w loci jądrowych (Moritz 1994, 1995). Każde z proponowanych podejść jest w pewnym stopniu arbitralne, gdyż trudno jest wyznaczyć wyraźną granicę definiującą poziom ESU na skali zróżnicowania genetycznego i czasu dywergencji populacji różnych gatunków (Avisé 2008). Koncepcja ESU powinna uwzględniać dwa uzupełniające się podejścia, zarówno fenotypowe różnice o znaczeniu adaptacyjnym (Ryder 1986; Crandall i wsp. 2000), jak również historyczny rozwój struktury genealogicznej populacji (Moritz 1994, 1999, 2002).

Zdecydowana większość gatunków charakteryzuje się posiadaniem niewielkiej liczby ESU, a poszczególne grupy zlokalizowane są w taki sposób, że można je logicznie powiązać z historią geograficzną badanych obszarów uwarunkowaną istnieniem znanych i domniemanych refugium glacialnych w plejstocenie oraz trasami postglacialnej rekolonizacji, czy też taksonomią, w przypadku której wyznaczone linie

mitochondrialnego DNA pokrywają się z opisanymi w tradycyjny sposób podgatunkami (Avisé 2008). Identyfikacja jednostek ESU wymaga zastosowania analiz różnych klas markerów genetycznych, spośród których najchętniej wybierany jest mitochondrialny DNA oraz loci zlokalizowane w jądrze komórkowym. Badania genetyczne przeprowadzone w oparciu o mitochondrialny DNA u niedźwiedzi brunatnych wskazały na istnienie około pięciu – sześciu jednostek ESU, czy też grup filogenetycznych, spośród których każda związana jest ściśle z określonymi rejonami, mianowicie z Ameryką Północną, Azją i Europą (Cronin i wsp. 1991; Taberlet i Bouvet 1994; Keis i wsp. 2013). W przypadku bobra eurazjatyckiego (*Castor fiber*), linie ewolucyjne mtDNA Wschodnia i Zachodnia, które rozdzieliły się około 100 000 – 360 000 lat temu i prawdopodobnie wywodzą się z oddzielnych refugium glacialnych, również zostały uznane za oddzielne jednostki ewolucyjnie istotne (Durka i wsp. 2005; Horn i wsp. 2011).

Durka i wsp. (2005) zaproponowali również, by osobniki należące do populacji reliktowych bobra eurazjatyckiego występujących we wschodniej części zasięgu tego gatunku, które doświadczyły drastycznych redukcji liczebności w końcu XIX wieku, uznać za jednostki zarządzania (ang. *management units*, MU; Crandall i wsp. 2000). Jednostki takie wyróżniane są w oparciu o dane genetyczne i ekologiczne i obejmują populacje wymieniające z innymi na tyle mało osobników, że zachowują swoją odrębność genetyczną i są demograficznie niezależne od innych populacji. Identyfikacja potencjalnych jednostek MU zachodzi głównie w oparciu o haplotypy mitochondrialnego DNA, przede wszystkim z uwagi na istotną rolę linii matczynej w demografii populacji (Moritz 1994; Avisé 1995). Z zasady dyspersja wielu, jeśli nie wszystkich gatunków jest zbyt niska, by zapewnić w każdym pokoleniu łączność demograficzną odległych geograficznie populacji, w związku z czym dla dowolnego gatunku populacje wykazujące współcześnie autonomię demograficzną, powinny być traktowane jako osobne MU (Avisé 2008).

Mimo, iż identyfikacja potencjalnych jednostek ESU i MU obarczona jest bardzo często licznymi problemami metodologicznymi, to w konkretnych przypadkach ustanowienie tych pojęć zalicza się do najważniejszych osiągnięć filogeografii w zastosowaniu do procesów mikroewolucyjnych (Avisé 2008). Dobrym przykładem tego typu działań jest wpisanie przez Międzynarodową Unię Ochrony Przyrody i Jej Zasobów (ang. *International Union for Conservation of Nature*, IUCN) do Międzynarodowej

Czerwonej Księgi zawierającej listę gatunków roślin i zwierząt zagrożonych, dwóch genetycznie i morfologicznie różnych, zachodnio-palearktycznych populacji jelenia szlachetnego: endemicznej populacji *C. e. corsicanus* oraz populacji *C. e. barbarus*. Populacja *C. e. corsicanus* występująca na Korsyce i Sardynii oraz reprezentująca dawną linię mitochondrialnego DNA została sklasyfikowana według IUCN jako „silnie zagrożona wyginięciem” (ang. *Endangered*, EN), natomiast populacja *C. e. barbarus*, obecnie ograniczona występowaniem zaledwie do niewielkiego obszaru ciągnącego się wzdłuż granicy tunezyjsko-algierskiej została uznana najpierw za jednostkę wysokiego ryzyka narażenia na wyginięcie (ang. *Vulnerable*, VU), a następnie za bliską zagrożenia „o niższym ryzyku wyginięcia” (ang. *Lower Risk*; Wemmer 1998; IUCN Red List 2007). Populacje obu podgatunków jelenia szlachetnego doświadczyły w XX wieku licznych efektów wąskiego gardła (ang. *bottleneck*), w konsekwencji których liczebność populacji *C. e. corsicanus* spadła do około 100 – 200 osobników (Kidjo i wsp. 2007). Analizy genetyczne potwierdziły redukcję liczebności w populacji jelenia korsykańskiego, wykazując istnienie bardzo niskiego poziomu zmienności genetycznej (Hmwe i wsp. 2006; Zachos i wsp. 2010). W przypadku populacji *C. e. barbarus* również stwierdzono zredukowany poziom zmienności genetycznej w porównaniu z pozostałymi europejskimi populacjami jelenia szlachetnego, ale spadek nie był na tyle niski, jakiego można by oczekiwać w świetle historii populacji (Hmwe i wsp. 2006).

Wpisanie do Międzynarodowej Czerwonej Księgi dwóch populacji jelenia szlachetnego, gatunku pospolitego w Europie, posiadającego status zwierzęcia łownego, jest dowodem na podejmowanie działań w zgodzie z zasadami Konwencji „O ochronie gatunków dzikiej flory i fauny europejskiej oraz ich siedlisk” (ang. *Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats*) sporządzonej w Bernie dnia 19.09.1979 roku, popularnie nazywanej Konwencją Berneńską. Celem Konwencji Berneńskiej jest zachowanie europejskich gatunków dziko żyjących zwierząt i roślin oraz ich naturalnych siedlisk, zwłaszcza gatunków endemicznych, zagrożonych i ginących, których ochrona wymaga współdziałania kilku państw. „Gatunek” traktowany jest w niej umownie, bowiem Konwencja uwzględnia także podgatunki, odmiany lub formy lokalnie zagrożone. Polska ratyfikowała Konwencję Berneńską dnia 1.01.1996 (Dz.U. 1996 Nr 58, poz. 263 i 264) i realizuje jej przepisy dzięki wprowadzeniu do ustawy o ochronie przyrody zakazu stosowania niedozwolonych metod zabijania i łowienia zwierząt, objęciu

ochroną prawną gatunków wpisanych do załącznika I i II konwencji (rozporządzenie Ministra Środowiska) oraz objęciu ochroną zwierząt łownych na mocy ustawy prawo łowieckie. Pozostaje to w zgodzie z ustawą o ochronie przyrody w Polsce z dnia 16.04.2004 (Dz.U. z 2004 r. Nr 92, poz. 880) w świetle której, cytując za art. 2: „*Ochrona przyrody, w rozumieniu ustawy, polega na zachowaniu, zrównoważonym użytkowaniu oraz odnawianiu zasobów, tworów i składników przyrody*”.

Zastosowanie markerów molekularnych w badaniach populacyjnych

Markery molekularne stanowią makromolekuły biologiczne występujące w postaci cząsteczek DNA lub białek, które stwarzają genetyczne ramy do badań z zakresu ekologii behawioralnej, pokrewieństwa oraz filogenezy (Avisé 2008).

Wśród markerów, najczęściej i najchętniej wykorzystywanym w badaniach z zakresu filogeografii jest mitochondrialny DNA, który często jest uważany za niemal idealne narzędzie genetyczne, niezastąpione w badaniach populacyjnych i filogeograficznych oraz używane do odtwarzania historii ewolucyjnej populacji (Avisé 2000). Z kilku powodów mtDNA jest dobrym wskaźnikiem zmienności wewnątrzgatunkowej. Po pierwsze, mtDNA występujący w komórce w bardzo wielu kopiach, jest cząsteczką haploidalną, w obrębie której nie zachodzi rekombinacja. Po drugie, jest on zazwyczaj dziedziczony wyłącznie w linii żeńskiej, co podkreśla jego zastosowanie w przeprowadzanych na szeroką skalę analizach filogeograficznych u gatunków, u których samice są płcią zdecydowanie bardziej filopatryczną niż samce (Støen i wsp. 2006; Keis i wsp. 2013). Mitochondrialny DNA jest ponadto wysoce zmienny w naturalnych populacjach zwierząt ze względu na wysokie tempo mutacji w porównaniu do jądrowego DNA, co pozwala wnioskować o niedawnych wydarzeniach demograficznych w populacji (Finger i Klank 2010). Przypuszcza się również, że mtDNA ewoluuje w prawie neutralny sposób, a poziom rozbieżności mtDNA powinien z grubsza odzwierciedlać czasy rozejścia się poszczególnych linii (Galtier i wsp. 2009). Stopień dywergencji genetycznej pomiędzy liniami ewolucyjnymi, wywodzącymi się z różnych refugium glacialnych, wykazuje wahania zarówno w przypadku różnych, jak i siostrzanych gatunków (Hewitt 2011a). Znaczny stopień dywergencji może wskazywać przede

wszystkim na długi okres, w którym poszczególne linie pozbawione były efektywnego kontaktu, czy też brak istotnego przepływu genów. Użycie dobrze skalibrowanego zegara molekularnego pozwala wyznaczyć przybliżony czas ich rozdzielenia się.

Badania filogeograficzne przeprowadzane w oparciu o analizy mitochondrialnego DNA, pozwalające badać procesy historyczne zachodzące w populacjach i gatunkach, odgrywają również bardzo istotną rolę przy podejmowaniu decyzji z zakresu ich ochrony i zarządzania (Davison i wsp. 2011; Swenson i wsp. 2011). Dodatkowo uważa się, że mtDNA jest najlepszym narzędziem do rozwiązywania problemów taksonomicznych (Wan i wsp. 2004), do identyfikowania regionów endemizmu (Proudfoot i wsp. 2006) oraz jednostek ewolucyjnie istotnych (ESU; Wan i wsp. 2004).

Mitochondrialny DNA jest markerem genetycznym, który pokazuje linię ewolucyjną wyłącznie jednego z rodziców, w związku z czym może w nieprawidłowy sposób odzwierciedlać historię całej populacji. Co więcej, nierzadko istnieją znaczne różnice w dostosowaniu lub zdolności dyspersyjnej pomiędzy poszczególnymi płciami (Palumbi i Baker 1994). Dlatego też istotne wydaje się przeprowadzenie analiz uwzględniających markery dziedziczone również w linii ojcowskiej, jak i markery autosomalne.

Badania zmienności markerów genetycznych znajdujących się na niepodlegającym rekombinacji chromosomie Y, wykorzystywane są do wykrywania rozmieszczenia męskich linii ewolucyjnych i do oceny relatywnego udziału samców w kształtowaniu struktury populacji (Hellborg i Ellegren 2003). Jak podają Autorzy (2003), informacje na temat otrzymanych haplotypów sekwencji chromosomu Y są dobrym uzupełnieniem danych uzyskanych dla markerów identyfikujących linie matczyne u samic w mtDNA, a także, po porównaniu z dywergencją genów jądrowych i mitochondrialnych, mogą być wykorzystane do oceny stopnia dyspersji samców. Generalnie, liczne analizy markerów znajdujących się na chromosomie Y, który jest bardzo podatny na działanie dryfu genetycznego (Hurles i Jobling 2001), u różnych gatunków ssaków, między innymi u bydła (*Bos taurus*), rysia (*Lynx lynx*) i renifera dowodzą istnienia bardzo niskiego poziomu zmienności nukleotydowej lub wręcz jej braku (Hellborg i Ellegren 2004). Potencjalne czynniki, mogące wytłumaczyć tak niski poziom zmienności genów zlokalizowanych na chromosomie Y obejmują selekcję, poligyniczny system kojarzenia, wzór migracji, czy też mechanizmy obniżające efektywną wielkość populacji samców

(Hellborg i Ellegren 2004). Z drugiej strony, analizy czterech intronów z grupy YCATS (ang. *Y chromosome conserved tagged sequences*, Hellborg i Ellegren 2003) u ryjówki malutkiej (*Sorex minutus*) w Europie pozwoliły zidentyfikować cztery linie ewolucyjne, które pozostają w opozycji do pięciu linii stwierdzonych w oparciu o analizy mtDNA (McDevitt i wsp. 2010).

Drugim chromosomem płci jest chromosom X, który z uwagi na posiadane cechy jest wyjątkowy i unikalny w ssaczym genomie (Ross i wsp. 2005). Samice dziedziczą chromosom X od każdego z rodziców, natomiast samcom przekazywany jest pojedynczy, matczyzny chromosom X. Chromosom X ma bardzo konserwatywny charakter, co jest konsekwencją jego ewolucji. Chromosomy płci wyewoluowały z pary autosomów w ciągu ostatnich 300 milionów lat. W trakcie tego procesu oryginalne, funkcjonalne elementy zostały zachowane na chromosomie X, podczas gdy Y utracił praktycznie wszystkie ślady ancestralnego autosomu, łącznie z genami, które dzielił z chromosomem X (Ohno 1973; Ross i wsp. 2005). Hellborg i Ellegren (2004) postulują, że zmienność nukleotydowa genów zlokalizowanych na chromosomach płci powinna być blisko trzy razy większa na X niż na Y.

Dużą popularnością w analizach populacyjnych cieszy się również mikrosatelitarny DNA, który stanowią krótkie, powtarzające się sekwencje kilku nukleotydów, losowo występujących w genomie i zlokalizowanych z reguły na autosomach (Goldstein i Schlötterer 2000). Większość loci ma charakter neutralny, a rozmieszczenie geograficzne poszczególnych alleli odzwierciedla wzór przepływu genów w populacjach. Charakteryzują się one znacznym polimorfizmem liczby powtórzeń danego motywu nawet między blisko spokrewnionymi liniami, w związku z dużą częstością mutacji, szacowaną na $10^{-2} - 10^{-6}$ na locus na pokolenie (Zhang i Hewitt 2003; Semagn i wsp. 2006). Analizy mikrosatelitarnego DNA są szeroko wykorzystywane do identyfikacji osobników i wyznaczenia pokrewieństwa genetycznego między osobnikami, a także do określenia parametrów wewnątrzpopulacyjnej zmienności genetycznej. Mikrosatelitarny DNA jest narzędziem z powodzeniem stosowanym do określania zróżnicowania między populacjami i poziomu przepływu genów między nimi. Ponadto, jego zastosowanie w badaniach ekologicznych i związanych z ochroną gatunkową pozwala identyfikować zmiany demograficzne zachodzące w populacjach, takie jak efekt wąskiego gardła, zmiany w efektywnej wielkości populacji (N_e) oraz wykrywać dryf genetyczny, jak również

definiować jednostki zarządzania (MU; Olivieri i wsp. 2008; Orsini i wsp. 2008; Finger i Klank 2010). Analizy mikrosatelitarnego DNA wykorzystywane są również w celu potwierdzenia istnienia linii ewolucyjnych u gatunków, stwierdzonych wcześniej w oparciu o analizy mtDNA oraz wyznaczenia stref kontaktu między nimi. W oparciu o loci mikrosatelitarne potwierdzono u żaby moczarowej na obszarze postglacjalnym Europy Północnej bardzo silny podział na linię Zachodnią i Wschodnią, wyznaczony na podstawie analiz mtDNA i jednocześnie zidentyfikowano między liniami, które skolonizowały Europę Północną z refugium Karpackiego i wschodniego, strefę kontaktu zlokalizowaną w Szwecji Północnej (Knopp i Merilä 2009). W przypadku, gdy proces kolonizacji obszarów postglacjalnych zachodził z różnych kierunków, znajduje to swoje odzwierciedlenie we wzroście zmienności allelicznej w obrębie gatunków. Populacje, które wywodzą się z różnych refugium, posiadają zazwyczaj odmienne zestawy alleli, z potencjalnie inną zdolnością do adaptacji, co może mieć wpływ na ich przeżycie w zmieniających się środowiskach (Liukkonen-Anttila i wsp. 2002). Ponadto, dystans genetyczny pomiędzy sąsiadującymi populacjami, wykazującymi inne zestawy alleli, może w strefie kontaktu być wyższy niż oczekiwany jedynie z dystansu geograficznego (Knopp i Merilä 2009).

Natomiast geny kompleksu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej kręgowców (Klein 1986; Janeway i wsp. 2004). Charakteryzują się one przede wszystkim znaczną zmiennością alleli, ich długą trwałością czasową i wysoką heterozygotycznością (Klein i wsp. 1993). W związku z tym, że wysoka zmienność loci MHC potencjalnie przyczynia się do wzrostu odporności przeciwko patogenom występującym w środowisku oraz do przeżycia gatunków, ich badania mają zasadnicze znaczenie przy projektowaniu planów ochronnego zarządzania gatunkami zwierząt (Yasukochi i wsp. 2012). Jedną z zaobserwowanych zależności jest istnienie niskiego polimorfizmu genów MHC w populacjach wyspowych, podczas gdy populacje zamieszkujące ląd stały utrzymują zdecydowanie wyższą zmienność, jak to ma miejsce między innymi w populacjach szczura australijskiego (*Rattus fuscipes greyii*; Seddon i Baverstock 1999), czy też skalniaka (*Petrogale lateralis*) należącego do kangurowatych (Mason i wsp. 2010). Wiele badań przeprowadzonych na dzikich ssakach, wykazuje związek pomiędzy niskim poziomem zmienności genów MHC i spadkiem dostosowania (Yasukochi i wsp. 2012). Ponadto,

populacje, czy też gatunki, które są zagrożone wyginięciem, bądź też doświadczyły w przeszłości efektu wąskiego gardła, charakteryzują się zredukowanym poziomem zmienności loci MHC (Spielman i wsp. 2004; Babik i wsp. 2005, 2009; Mainguy i wsp. 2007; Radwan i wsp. 2007). Północna populacja słonia morskiego (*Mirounga angustirostris*), która doświadczyła w przeszłości redukcji liczebności, wykazuje znacznie mniejszą zmienność w locus *DQB*, w porównaniu z południową populacją słonia morskiego (*Mirounga leonina*), która nie przeszła przez *bottleneck* (Lento i wsp. 2003; Weber i wsp. 2004; Yasukochi i wsp. 2012). Pomimo iż wiele badań wykazuje korelacje pomiędzy zmiennością loci MHC i odpornością przeciwko chorobom infekcyjnym, nie wydaje się jednak, by była to zasada uniwersalna. Zmienność genetyczna MHC u uchatki kalifornijskiej (*Zalophus californianus*), która jest gatunkiem w znakomitej kondycji, jest zdecydowanie mniejsza niż u innych gatunków ssaków (Bowen i wsp. 2002, 2004). Z kolei, bardzo niski poziom lub wręcz brak zmienności, między innymi w locus *DRB* u kozła śnieżnego (*Oreamnos americanus*; Mainguy i wsp. 2007), najprawdopodobniej nie wpływa na wzrost podatności na choroby (Mikko i wsp. 1999). Zredukowana zmienność w loci MHC może być efektem redukcji liczebności populacji w trakcie postglacjalnej ekspansji odbywającej się na terenach umiarkowanych i borealnych (Babik i wsp. 2009). Geny MHC znajdują się potencjalnie pod wpływem doboru naturalnego, a głównym źródłem doboru działającym na ich zmienność wydaje się być presja pasożytów (Paterson i wsp. 1998; Hedrick i Kim 2000; Lachish i wsp. 2007). Drugą istotną siłą ewolucyjną odgrywającą rolę w ewolucji MHC jest dryf genetyczny. Przy czym dobór naturalny może działać przez krótki okres czasu, jednak ślady jego działania mogą być widoczne we wzorcach zmienności sekwencji przez tysiące pokoleń (Garrigan i Hedrick 2003). Z drugiej strony, szereg badań porównujących zmienność genów MHC ze zmiennością loci neutralnych pokazuje, że kiedy wielkość populacji jest niewielka, zmienność genów MHC może być kształtowana głównie przez procesy demograficzne i dryf genetyczny (Radwan i wsp. 2010). Analizy wzorców zmienności loci MHC często dostarczają dowodów na działanie nie tylko doboru, ale także dryfu genetycznego (Aguilar i Garza 2006; Alcaide i wsp. 2007; Babik i wsp. 2008; Oliver i wsp. 2009). Wzór południowej „obfitości” i północnego „ubóstwa” obserwowany w neutralnie ewoluujących loci, takich jak mtDNA czy też mikrosatelitarny DNA u gatunków zamieszkujących regiony, na które oddziaływały oscylacje plejstocénskiego klimatu, znajduje swoje odzwierciedlenie również

w badaniach loci MHC. Sugeruje on, że zdarzenia demograficzne odegrały decydującą rolę w kształtowaniu zmienności loci MHC w populacjach z terenów północnych (Babik i wsp. 2009).

Historia populacji łośia na świecie i w Polsce

Łoś (*Alces alces*, Linnaeus 1758) jest drugim co do wielkości, zaraz po żubrze (*Bison bonasus*), żyjącym przedstawicielem ssaków lądowych Europy. Reprezentuje on rząd parzystokopytnych (Artiodactyla), rodzinę jeleniowatych (Cervidae), liczącą 40 gatunków występujących na całym świecie (Grubb 1993). Według nowego podziału zaproponowanego przez Gilberta i wsp. (2006), w skład rodziny Cervidae wchodzi podrodzina Cervinae, złożona ze szczepów Cervini (*Cervus*, *Axis*, *Rucervus* i *Dama*) i Muntiacini (*Muntiacus* i *Elaphodus*) oraz podrodzina Capreolinae, ze szczepami Alceini (*Alces*), Capreolini (*Capreolus* i *Hydropotes*) oraz Odocoileini (*Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Mazama*, *Odocoileus*, *Ozotoceros*, *Pudu* i *Rangifer*). Trzy szczepy podrodziny Capreolinae powstały w Azji Centralnej w trakcie miocenu/pliocenu, natomiast plemiona Alceini i Capreolini wyodrębniły się od Odocoileini podczas pliocenu około 7,4 miliona lat temu (Breda i Marchetti 2005; Gilbert i wsp. 2006). W Europie występuje pięć rodzajów należących do rodziny Cervidae, spośród których w faunie Polski obok łośia występuje jelen szlachetny, daniel (*Dama dama*) i sarna europejska. Szczep Alceini, do którego zaliczamy wszystkich przedstawicieli rodzaju *Alces*, powstał około 1,5 miliona lat temu, podczas wczesnego plejstocenu w Azji Centralnej, względnie w Europie (Heintz i Poplin 1981; Thouveny i Bonifay 1984; Kahlke 1990). Z drugiej strony, Kostron (1938) dokumentuje, że łoś wywodzi się z pliocenu, trwającego około 2,7 miliona lat (5 333 000 – 2 588 000 lat temu), przy czym liczniej został odnotowany dopiero około 1 miliona lat temu w plejstocenie, a więc w okresie z którego pochodzą europejskie znaleziska szczątków łośia, jelenia, żubra czy mamuta (Sommer i Nadachowski 2006). Współcześnie żyjący gatunek *Alces alces* wyewoluował z kolei w Azji, a następnie dokonał kolonizacji Europy oraz Ameryki Północnej (Hundertmark i wsp. 2002a, b). Najwcześniejsze znalezione do tej pory skamieniałości należące do gatunku *Alces alces* datowane są na mniej więcej 100 000 lat temu, a sama transformacja z *A. latifrons* w *A. alces* zaszła

w Eurazji między 200 000 a 100 000 lat temu, a więc w górnym plejstocenie (Lister 1993). Z drugiej strony, Guthrie (1995) na podstawie znalezionych skamieniałości sugeruje znacznie późniejsze powstanie gatunku *Alces alces* i obecność jego domniemanego przodka, *A. latifrons*, na obszarze cieśniny Beringa jeszcze jakieś 35 000 lat temu. Skamieniałości znalezione na kontynencie europejskim wskazują, że zasięg występowania łośia w okresie prehistorycznym oraz w późnym plejstocenie obejmował całą Europę Północną i Środkową, na południu sięgając po Rumunię, Włochy Północne oraz Pireneje i dokładnie pokrywał się z zasięgiem renifera (Dzięciołowski i Pielowski 1993; Schmölcke i Zachos 2005). W trakcie szczytu ostatniego zlodowacenia łoś przetrwał w refugium Bałkańskim, na Półwyspie Apenińskim oraz w Karpatach (Sommer i Nadachowski 2006). Łoś należy do grupy dużych ssaków, które jako jedne z pierwszych dokonały ponownej kolonizacji Europy Centralnej postępującej w miarę zaniku pokrywy lodowej po ostatnim LGM (Willms 1987; von Koenigswald 2002; Schmölcke i Zachos 2005).

Analizy regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA u łośia pozwoliły zidentyfikować trzy haplogrupy: azjatycką, europejską i północnoamerykańską, których rozmieszczenie jest ściśle związane z kontynentami, na których występuje łoś (Hundertmark i wsp. 2002a). Z uwagi na brak kalibracji tempa mutacji dla łośia wydaje się, że data rozdzielenia się poszczególnych haplogrup oraz data światowej demograficznej ekspansji łośia, pozostają otwartymi hipotezami. Mikko i Andersson (1995), bazując na sekwencjach regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA i wykorzystując tempo mutacji dla człowieka (Stoneking i wsp. 1992) oraz dla bydła domowego i bizona (*Bison bison*; Loftus i wsp. 1994), wyznaczyli czas rozdzielenia się łośi występujących w Szwecji i Ameryce Północnej na blisko 350 000 do 165 000 lat temu. Z drugiej strony Hundertmark i wsp. (2002a) opierając się na tempie mutacji regionu kontrolnego mtDNA przewidzianym dla bydła domowego (Bradley i wsp. 1996) oraz żubra (Burzyńska i wsp. 1999), określili czas rozdzielenia się łośi z haplogrupy Azjatyckiej i Europejskiej na 38 000 i 30 000 lat temu, natomiast łośi azjatyckich i północnoamerykańskich na 27 000 i 21 500 lat temu. Bazując na wspomnianym tempie mutacji Hundertmark i wsp. (2002a) ustalili, że czas ekspansji łośi eurazjatyckich miał miejsce prawdopodobnie 59 000 i 47 000 lat temu oraz, że w stosunku do łośi z Ameryki Północnej, łośie eurazjatyckie przeszły ekspansję 4,2 razy wcześniej. Porównując jednak łośia z innymi gatunkami z rodziny Cervidae, przedstawione wyniki wydają się być nieco zaskakujące. Matosiuk

i wsp. (w recenzji) w oparciu o połączone sekwencje regionu kontrolnego i cytochromu *b* mitochondrialnego DNA ustalili czas rozdzielenia się linii Wschodniej i Zachodniej sarny europejskiej na około 350 000 – 290 000 lat temu, natomiast linii w obrębie sarny syberyjskiej (*Capreolus pygargus*) na blisko 370 000 lat temu. Co więcej, analizy regionu kontrolnego mtDNA u jelenia szlachetnego wskazują, że dwie linie europejskie, Zachodnia i Wschodnia, wyodrębniły się najprawdopodobniej mniej więcej 272 300 lat temu (Skog i wsp. 2009).

Rozmieszczenie geograficzne łośia w Europie w pełni odzwierciedla przemiany klimatyczne i środowiskowe, jakie zaszły po ustąpieniu ostatniego zlodowacenia, a więc około 12 000 – 10 000 lat temu (Raczyński 2006). Procesowi kolonizacji Europy przez łośie sprzyjała, wykorzystywana przez nie w ich pełnym cyklu rocznym bogata baza żerowa, którą stanowiły zakrzewienia łożowe i wierzbowo-brzozowe w bagiennych obniżeniach i dolinach rzek. Okres borealny holocenu, trwający około 9 000 – 8 000 lat temu, który związany był z rozwojem borów sosnowych oraz lasów liściastych na żyznych siedliskach, był najprawdopodobniej najbardziej korzystnym dla łośia okresem klimatycznym, jaki wystąpił na kontynencie europejskim. Wówczas to, między innymi, łośie skolonizowały obszar Skandynawii, a trasy kolonizacji wiodły przez Niemcy do Szwecji oraz z Rosji przez Karelię do Finlandii i Szwecji Północnej (Schmölcke i Zachos 2005). Haplotypy mtDNA stwierdzone u łośi ze Szwecji reprezentują wyjątkową w skali haplogrupy Europejskiej gałąź ewolucyjną, która skolonizowała ten region z południa, prawdopodobnie z innego refugium glacialnego niż pozostałe łośie w Skandynawii należące do kladu grupującego haplotypy typowe dla łośi występujących w Europie Wschodniej (Hundertmark i wsp. 2002a). Populacja w Szwecji, w której zidentyfikowany został unikalny wariant genetyczny mitochondrialnego DNA, wyraźnie różny od pozostałych stwierdzonych w Europie haplotypów, uznana została za populację reliktową (Hundertmark i wsp. 2002a).

Analizy rozmieszczenia i liczebności łośia w Europie wykazały, że oba te parametry charakteryzują się bardzo dużymi wahaniami. Zapisy historyczne i wykopaliska archeologiczne wskazują, iż jeszcze kilkaset lat temu łoś, który licznie występował w całej strefie leśnej Europy, w czasach historycznych podzielił los tura, zubra i tarpana (*Equus gmelini*), ulegając presji gwałtownie rozwijającej się populacji ludzkiej (Raczyński 2006). W okresie od średniowiecza do połowy XIX wieku w wyniku kłusownictwa oraz

rosnącego popytu na skóry przeznaczone na wyposażenie armii carskiej, łoś został wyteplony w większości krajów Europy Zachodniej i Środkowej. Na początku XIX wieku został uznany za gatunek bliski wyginięcia w tych krajach Europy, w których obecnie tworzy trwałe i stabilne populacje, mianowicie w Szwecji, Finlandii, Rosji czy Polsce (Rülcker i Sätzelfelt 1986; Schmölcke i Zachos 2005). W wiek XX populacja łośi weszła w stan poważnego zagrożenia wyginięciem w obrębie całego geograficznego zasięgu tego gatunku (Raczyński 2006).

Łoś stanowił istotny element fauny Polski od końca epoki lodowcowej do wczesnego okresu średniowiecza (Wyrost 1993; Gumiński 2003). Na początku XIX wieku nastąpiło załamanie liczebności populacji łośia do tego stopnia, że tylko lasy w okolicach Rajgrodu w dolinie Biebrzy stanowiły wówczas najbardziej na zachód wysuniętą ostoję tego gatunku na ziemiach polskich (Brincken 1826). Taki obraz przedstawiający rozmieszczenie łośia w Polsce nie uległ zasadniczym zmianom aż do okresu międzywojennego, kiedy gatunek ten występował jedynie we wschodnich rejonach Rzeczypospolitej (Raczyński 2006). Autochtoniczną populacją, która przetrwała II wojnę światową, była grupa kilku – kilkunastu osobników zamieszkujących dolinę Biebrzy, która jeszcze przed wojną została poddana specjalnej ochronie obszarowej, związanej z utworzeniem w 1925 roku rezerwatu Czerwone Bagno, mającej na celu zachowanie ciągłości występowania tego rzadkiego wówczas w Polsce gatunku (Lublinerówna 1935). Bytującej tu populacji łośi, złożonej z zaledwie kilku – kilkunastu osobników, nie tylko udało się przetrwać okres II wojny światowej, ale także w latach 50. XX wieku dać początek stadu, które złożone z potomków rodzimej, autochtonicznej populacji, stanowiło kontynuację pierwotnego zasiedlenia tych ziem (Dzięciołowski i Pielowski 1993; Raczyński 2006). Dzięki rozporządzeniu Ministra Leśnictwa z 1952 roku, łośie zostały w Polsce objęte ochroną pełną, której podlegały do momentu ukazania się ustawy z dnia 17 czerwca 1959 roku *"O hodowli, ochronie zwierząt łownych i prawie łowieckim"*, zgodnie z którą łośie zostały wpisane na listę zwierząt łownych z całorocznym okresem ochronnym, co w praktyce oznaczało zachowanie statusu ochronnego dla tego gatunku (Raczyński 2006).

Obok tej rozwijającej się od końca lat 40. XX wieku autochtonicznej populacji biebrzańskiej, dynamiczny rozwój przeżywała także populacja łośia w Kampinoskim Parku Narodowym. W przeciwieństwie jednak do łośi z doliny Biebrzy, populacja ta

została założona przez człowieka w 1951 roku w wyniku translokacji trzech młodych kłep i dwóch byków z Białorusi (Dzięciołowski i Pielowski 1993). Przez blisko siedem lat osobniki te i ich potomstwo trzymane były w specjalnie do tego celu przygotowanej zagrodzie, którą po kilku latach usunięto, pozwalając, by łosie utworzyły populację wolnościową (Dzięciołowski i Pielowski 1993). Gębczyńska i Raczyński (1999) wysunęli przypuszczenie, że to przede wszystkim dzięki tej dynamicznie rozwijającej się populacji kampinoskiej, łoś kolonizował niezasiedlone przez ten gatunek tereny Polski Zachodniej i tworzył tam lokalne populacje wykazujące cechy silnych ekologicznie grup z szansami przetrwania w dłuższej perspektywie.

Po II wojnie światowej areal występowania, jak i liczebność populacji łośi uległy tendencji wzrostowej, doprowadzając do pomyślnego, aczkolwiek nieoczekiwanego odradzania się tego gatunku w granicach jego arealu, zwłaszcza w Syberii Zachodniej i Kazachstanie, oraz w strefie nadbałtyckiej. Szczyt tego rozwoju, nazywany „eksplozją demograficzną łośia” przypadł na okres lat 50 – 70. ubiegłego wieku, a wśród głównych przyczyn tego zjawiska wskazywane były procesy przyrodnicze, takie jak wyrąb drzewostanów, odnowienia lasów gatunkami preferowanymi przez łośie, w szczególności sosną, zalesienia gruntów porolnych i zadrzewienia zainicjowane przez człowieka synchronicznie w całej strefie występowania gatunku oraz systemowe tępienie w tym czasie wilka (Lenkowa i Panfil 1973; Raczyński 2006). Polska, jako kraj położony na zachodnim skraju kontynentalnego zasięgu łośia, wkrótce znalazła się w strefie oddziaływania tej tendencji populacyjnej (Raczyński 2006). Szczyt liczebności populacja łośi osiągnęła w Polsce w 1981 roku, kiedy wielkość krajowej populacji, według urzędowej statystyki łowieckiej, została oszacowana na blisko 6 200 sztuk (Dzięciołowski i Pielowski 1993; Gębczyńska i Raczyński 2001). Obok ochrony, umiarkowanego pozyskania oraz intensyfikacji gospodarki leśnej, ważną rolę w odbudowie liczebności łośi odegrała również imigracja osobników przez północną i wschodnią granicę Polski. Według hipotezy zaproponowanej przez Raczyńskiego (2006) imigracja łośi do Polski z terytorium Białorusi, Litwy, Obwodu Kaliningradzkiego oraz Ukrainy była bardzo ważnym czynnikiem, ponieważ potencjał rodzimej populacji biebrzańskiej nie mógł zapewnić takiego wzrostu pogłowia, jakie dokonywało się w tym regionie. Niestety, nadmierna eksploatacja łowiecka, jaka miała miejsce w latach 80. i 90. ubiegłego wieku wkrótce doprowadziła jednak do ponownej, znacznej redukcji pogłowia łośia do 1/4 stanu

liczebnego w stosunku do początku lat 80. XX wieku, a więc spadek był większy niż 75%. W efekcie tych procesów istotnie skurczył się także zasięg występowania łośia w Polsce. Dopiero decyzja Ministra Środowiska z 2001 roku wprowadzająca *moratorium* na odstrzał łośia, po dwunastu latach jego obowiązywania pozwoliła na odbudowę stanu liczebnego populacji. Według urzędowej statystyki obejmującej obwody łowieckie i ważne dla łośia parki narodowe, stan łośi wzrósł w 2013 roku do około 16 000 osobników. Inwentaryzacja łośi, podobnie jak innych jeleniowatych, za pomocą dostępnych narzędzi i metod obarczona jest jednak poważnymi ograniczeniami, o czym świadczą dane Polskiego Związku Łowieckiego, według których w Polsce w 2013 roku liczebność łośi oceniono na 10 000 sztuk.

Obecnie łoś zasiedla znaczne obszary Polski, wśród których możemy wyróżnić trzy podstawowe ostoje: największa, bo obejmująca około 70% wszystkich żyjących osobników, to Polska północno-wschodnia wraz z autochtoniczną populacją łośi w dolinie Biebrzy, następnie populacja w Kampinoskim Parku Narodowym i okolicznych nadleśnictwach, utworzona przez potomków osobników reintrodukowanych z Białorusi, a nawet wskutek wtórnych translokacji z Puszczy Białowieskiej przez potomków byka o szwedzkim rodowodzie (Karpiński 1951) oraz Poleski Park Narodowy. Gębczyńska i Raczyński (2004) sugerowali, że populacja biebrzańska, która zasiedliła obszar doliny Biebrzy najprawdopodobniej po ostatnim zlodowaceniu jest autochtoniczna i może stanowić relikw sizerszego, holocenijskiego zasięgu tego gatunku. Populacja ta doświadczyła serii licznych redukcji liczebności w czasach historycznych, od stuleci stanowiła południowo-zachodni skraj naturalnego zasięgu łośia w Europie i była w znacznym stopniu izolowana od innych europejskich populacji tego gatunku (Raczyński 2006).

W niniejszej pracy sformułowałam następujące cele:

CEL 1: Określenie struktury genetycznej unikalnej w skali Europy Środkowej populacji

łośi w dolinie Biebrzy za pomocą różnych klas markerów molekularnych:

- potwierdzenie, że w populacji biebrzańskiej występują warianty genetyczne zdecydowanie różniące się od pozostałych stwierdzonych w Europie,
- oszacowanie stopnia dywergencji genetycznej oraz czasu rozdzielenia się linii mitochondrialnego DNA reprezentującej łośie biebrzańskie od innych linii ewolucyjnych łośia w Polsce i Europie,
- wykazanie, że populacja łośi w dolinie Biebrzy jest odrębna genetycznie od populacji z którymi sąsiaduje,
- wyznaczenie poziomu zmienności genetycznej w wybranych populacjach łośi w Polsce,
- określenie struktury pokrewieństwa osobników w wybranych populacjach łośi w Polsce.

CEL 2: Wyznaczenie czynników wpływających na obecne zróżnicowanie genetyczne między populacjami łośi w Polsce:

- zweryfikowanie hipotezy, że zmienność genetyczna w małych populacjach jest mniejsza niż w dużych,
- określenie poziomu efektywnej dyspersji osobników różnej płci,
- przetestowanie, czy w populacjach łośi obecny jest sygnał działania doboru naturalnego.

CEL 3: Wyznaczenie źródeł i kierunków powojennej ekspansji łośia w Polsce za pomocą różnych klas markerów i o różnym sposobie dziedziczenia:

- wyznaczenie liczby i rozmieszczenia odrębnych genetycznie grup populacji łośi w Polsce,
- określenie roli imigracji, translokacji osobników z różnych populacji spoza Polski oraz ekspansji autochtonicznej populacji łośi z doliny Biebrzy w kształtowaniu obecnej struktury genetycznej populacji łośi w Polsce.

MATERIAŁ I METODY

Obiekt badań

Taksonomia gatunku

Łoś (*Alces alces* Linnaeus, 1758) jest ssakiem należącym do rzędu parzystokopytnych (Artiodactyla), rodziny jeleniowatych (Cervidae), podrodziny Capreolinae, szczepu Alceini, rodzaju *Alces* (Pucek 1984; Gilbert i wsp. 2006). Flerov (1952) na podstawie zróżnicowania morfologicznego wyróżnił w obrębie rodzaju *Alces* dwa gatunki: *A. alces* występujący w Europie i Azji Zachodniej oraz *A. americana* w Ameryce Północnej i Azji Wschodniej. Hipoteza ta znalazła swoje potwierdzenie w badaniach polimorfizmu chromosomowego, mianowicie u osobników euroazjatyckich stwierdzono kariotyp $2N = 68$ (Gustavsson i Sundt 1968), podczas gdy u łosi z Ameryki Północnej i Azji Wschodniej kariotyp $2N = 70$ (Hsu i Benirschke 1973; Boeskorov 1996). Różnica ta interpretowana jest jako efekt mutacji typu Robertsona dwóch akrocentrycznych chromosomów w pojedynczy chromosom metacentryczny lub odwrotnie. Sipko i Kholodova (2009) argumentują, że pod koniec okresu glacialnego zachodniosyberyjskie i wschodniosyberyjskie populacje łosi były skutecznie izolowane od siebie wskutek obecności bariery, jaką stanowiło jezioro Mansi, dwa razy większe niż Morze Czarne, co mogłoby tłumaczyć różnice w liczbie chromosomów obserwowane współcześnie pomiędzy populacjami zachodnimi i wschodnimi. Dodatkowym poparciem zaproponowanego przez Flerova (1952) podziału okazały się analizy regionu kontrolnego mtDNA (mtDNA-cr) przeprowadzone przez Mikko i Andersson (1995), które wykazały, że u łosi z Ameryki Północnej występuje delecja o długości 75 par zasad, nieobecna u łosi europejskich. Indel ten został znaleziony także u niektórych łosi w Azji Wschodniej (Hundertmark i wsp. 2002a; Udina i wsp. 2002). Polimorfizm stwierdzony w kariotypach i mitochondrialnym DNA skorelowany z geograficznym rozmieszczeniem łosi, według Hundertmarka i wsp. (2002a) w niewystarczający jednak sposób uzasadnia zaproponowany podział. Bowyer i wsp. (2000) dowodzą, że liczba chromosomów nie powinna być traktowana, jako główny wyznacznik służący do wyróżniania gatunków

wśród dużych ssaków. Hundertmark i wsp. (2002a) w celu przetestowania hipotezy 2-gatunkowej, a także 3-gatunkowej zakładającej, że na każdym kontynencie występuje oddzielny gatunek, przeprowadzili analizy mitochondrialnego DNA u łośi. Na podstawie uzyskanych wyników Autorzy (2002a) stwierdzili, że żaden z zaproponowanych podziałów nie ma wystarczającego poparcia i *de facto* mamy do czynienia z jednym gatunkiem łośia na całej kuli ziemskiej.

Biologia gatunku

Łoś preferuje duże kompleksy leśne obfitujące w torfowiska i bagna, zakrzaczone tereny nadrzeczne, łatwo przystosowuje się również do lasów zagospodarowanych, położonych często w pobliżu dużych aglomeracji miejskich. Tereny, na których występuje, charakteryzują się różnorodną bazą żerową, a na jego pokarm składają się rośliny zielne, liście, pędy i kora drzew oraz krzewów (Dzięciołowski i Pielowski 1993). Urozmaicenie diety łośia mogą stanowić rośliny podwodne, do zdobycia których osobniki wykorzystują swoje dobre umiejętności pływackie.

Łoś należy do zwierząt, których maksymalna aktywność dobową odnotowywana jest w godzinach porannych i późnowieczornych. Kłepy wraz z młodymi tworzą stada złożone z kilku osobników, do których na czas rui dołączają żyjące oddzielnie i nieposiadające bronionego terytorium byki. Ruja trwa od końca sierpnia do połowy października, a jej główne nasilenie przypada w drugiej połowie września. Największą aktywność w tym okresie wykazują byki około 10-letnie i kłepy 6 – 8-letnie. W maju i na początku czerwca rodzą się młode w liczbie 1 – 2 sztuk (Dzięciołowski i Pielowski 1993). U łośia spotykane są dwie formy poroża, od charakteru których określa się byka mianem łopatacza lub badylarza, istnieją także liczne formy pośrednie (Gębczyńska i Raczyński 2001). Maksymalna długość życia łośi szacowana jest na około 20 lat. Obecnie, kiedy obowiązuje *moratorium* na odstrzał łośia, najważniejsze zagrożenie dla tego gatunku stanowią drapieżniki, przede wszystkim wilki, dziczka, wałęsające się psy i bardzo rzadko rysie (Pucek 1984) oraz pasożyty (Demiaszkiewicz i wsp., dane niepubl.).

Migracje sezonowe i długodystansowe

Łoś należy do grupy gatunków wykazujących sezonowe preferencje środowiskowe i żerowe (Gębczyńska i Raczyński 1993). Tendencja do sezonowych zmian ostoi letnich (bagiennych) i zimowych (borowych) jest charakterystyczną, regularnie obserwowaną cechą behawioru pokarmowego populacji bytującej w dolinie Biebrzy (Gębczyńska i Raczyński 1984). Dolina Biebrzy, porośnięta w głównej mierze przez torfowiska niskie, jest optymalnym środowiskiem do rozwoju populacji łosia, anatomicznie przystosowanego do wędrówek po podmokłych turzycowiskach (Gębczyńska i Raczyński 2001). Badania prowadzone przez Gębczyńską i Raczyńskiego (1997) z wykorzystaniem metody liczeń z powietrza i naziemnej metody próbných pędzeń wykazały, że w sezonie wegetacyjnym łosie preferują obszary bagienne, natomiast po pierwszych mrozach, a zwłaszcza po nadejściu śniegów, wędrują do otaczających je borów sosnowych porastających suche, mineralne obrzeża doliny, gdzie żerują, głównie w młodnikach sosnowych. Ruchliwość tych zwierząt w tym okresie znacznie się zmniejsza, co przekłada się na średni dystans 0,5 – 1 km pokonywany w ciągu doby. Jak wynika z obserwacji prowadzonych przez Gębczyńską i Raczyńskiego (1997), intensywność przemieszczeń zimowych związana jest z wysokością pokrywy śnieżnej, ponieważ podczas mało śnieżnej zimy wiele łosi pozostawało na bagnach, gromadząc się w sukcesyjnych zakrzaczach. W dolinie Biebrzy istnieją również takie obszary, jak uroczysko Lisie Nory, które ze względu na bogatą bazę żerową, utworzoną przez zarośla wierzbowo-brzozowe, pełnią rolę całorocznych ostoi (Gębczyńska i Raczyński 1984).

Biologia gatunku oraz wymogi środowiskowe sprawiają, że łosie odbywają również wędrówki w ciągu całego roku na dłuższe dystanse, dające możliwość rozszerzenia zasięgu gatunku, dla których bodźcem może być przegęszczenie populacji w dotychczasowej ostoi, czy też wyczerpywanie się bazy żerowej (Dzięciołowski i Pielowski 1993). Jako szlaki migracyjne zwierzęta te wykorzystują doliny rzeczne, jak np. dolina Sanu, przez którą podejmowały wędrówki na obszar Polski, bądź też przyległe kompleksy leśne, takie jak Puszcza Augustowska, częściowo sięgająca aż na Litwę i Białoruś (Gębczyńska i Raczyński 2004).

Teren badań

Badania prowadziłam w latach 2007 – 2011 na obszarze głównego zasięgu łośia w Polsce (Ryc. 1). Ogółem próby, którymi dysponowałam, pochodziły z 27 populacji łośia z Polski oraz z dwóch populacji spoza granic Polski: z Litwy i Niemiec (Ryc. 1, Tabela 1 i 2). Z obszaru Polski północno-wschodniej, na terenie której bytuje 70% krajowej populacji gatunku, zebrany przeze mnie materiał stanowił blisko 49% ogółu wszystkich prób. Z przyczyn środowiskowych i historycznych najcenniejszą ostoją łośia w Polsce jest dolina Biebrzy, będąca ostatnim zachowanym naturalnym kompleksem bagiennym położonym na skraju Europy Środkowej, stanowiącym optimum środowiskowe dla łośia (Gębczyńska i Raczyński 1984, 1993). W podziale doliny Biebrzy wyróżnione zostały trzy baseny: górny, zwany północnym, o powierzchni 45 tys. ha, obejmujący odcinek rzeki od źródeł do przewężenia w rejonie Sztabina wraz z południową częścią Puszczy Augustowskiej, basen środkowy zajmujący 79 tys. ha, rozszerzony trapezowo, ograniczony zwężeniem w okolicy Osowca oraz basen dolny, czyli południowy, najbardziej naturalny i zabagniony, rozciągający się na obszarze 70 tys. ha, związany z południowym przebiegiem Biebrzy od Osowca do ujścia Narwi (Gębczyńska i Raczyński 1993). Pilotażowe wyniki badań genetycznych (Świsłocka i wsp. 2008), które wykazały istnienie w dolinie Biebrzy unikalnej linii ewolucyjnej łośia, wyraźnie zróżnicowanej od pozostałych linii tego gatunku w Europie sprawiły, że z tego obszaru pobrałam relatywnie największą liczbę prób – 26%, w porównaniu do pozostałych populacji z Polski. Próby pochodziły z obszaru trzech basenów doliny Biebrzy, przy czym wielkość zebranego materiału była ściśle skorelowana z ilością osobników występujących w poszczególnych basenach (Tabela 1).

Materiał do badań i liczebność prób

Próby współczesne

Materiał do badań, pochodzący z całego zasięgu występowania łośia w Polsce oraz z terenu Litwy i Niemiec, pobierałam w latach 2007 – 2011, wykorzystując wyłącznie

metody nieinwazyjne. W pracach terenowych uczestniczyli pracownicy Zakładu Zoologii Kręgowców Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku oraz leśnicy, pracownicy parków narodowych i myśliwi.

Zebrany materiał, ze względu na zastosowane zestawy do izolacji DNA oraz startery wykorzystane w reakcji amplifikacji, podzieliłam na następujące kategorie:

- (1) odchody, w liczbie 679 prób (667 z Polski i 12 z Litwy), które zbierane były każdej zimy w poszczególnych latach trwania prac terenowych;
- (2) tkanki, przede wszystkim mięśnie, pochodzące od 216 osobników (207 z Polski i 9 z Niemiec);
- (3) suche pozostałości tkanek miękkich pobrane z 57 trofeów łowieckich i zrzutów (49 z Polski i 8 z Litwy) oraz 17 żuchw łosi z Polski.

Próby muzealne

Do analiz wykorzystałam również materiał muzealny, znajdujący się w kolekcji Instytut Biologii UwB, który stanowiły żuchwy 92 osobników zastrzelonych w trakcie polowań w latach 1987 – 1994 na terenie doliny Biebrzy (BIE_M, $N = 16$), Puszczy Knyszyńskiej (PKN_M, $N = 17$), Mazur (MAZ_M, $N = 28$), doliny Narwi/Nurca (NNU_M, $N = 16$) oraz nadleśnictwa Biała Podlaska (BPD_M, $N = 15$).

Analizy genetyczne

Izolacja DNA genomowego

DNA genomowe izolowałam stosując komercyjne zestawy kolumnowe Qiagen (Hilden, Niemcy). Do izolacji DNA z prób mięśniowych, cebulek włosowych, tkanek miękkich pobranych z poroży i żuchw wykorzystałam zestaw Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, natomiast w przypadku izolacji DNA z odchodów, zestaw Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kit. Procedura tej analizy składa się z (i) lizy błon komórkowych, jądrowych i organelowych, skutkującej uwolnieniem kwasów nukleinowych i białek, (ii) precypitacji DNA na złożu krzemionkowym, (iii) oczyszczania DNA z pozostałości

komórek i innych zanieczyszczeń oraz (iiii) elucji DNA buforem AE (Qiagen). Metoda ta zapewnia uzyskanie dobrej jakości DNA, wymaganego do przeprowadzenia podstawowych technik molekularnych oraz dającego się przechowywać w temperaturze -20°C przez okres kilku lat.

Izolacja DNA z prób tkankowych

Procedurę izolacji DNA z prób tkankowych przeprowadziłam zgodnie z protokołem izolacji DNA z tkanek zwierzęcych. Z przechowywanych w temperaturze -20°C prób odcinałam niewielki fragment, około 25 mg i zawieszałam w 180 µl buforu lizującego ATL. Następnie, po dodaniu do każdej próby 20 µl proteiny K, inkubowałam próby w 56°C (Thermo Shaker TS-100 Biosan) do momentu całkowitego strawienia tkanki. Etap ten zwykle trwał od 4 do 6 godzin, chociaż w przypadku niektórych prób proces trawienia trwał do 12 godzin. Do tak przygotowanego materiału dodawałam 200 µl buforu AL i po intensywnym wytrząsaniu w wirówce typu worteks (wortex tecnoKartell TK3S) dodawałam po 200 µl 96% alkoholu etylowego. W ten sposób otrzymaną mieszaninę przenosiłam na specjalne kolumny, które wirowałam minutę przy 8 000 obr./min. (Eppendorf Centrifuge 5415D, rotor F45-24-11). DNA związane ze złożem krzemionkowym kolumny przepłukiwałam następnie 500 µl buforu AW1. Próby wirowałam minutę przy 8 000 obr./min., a następnie dodawałam taką samą ilość buforu AW2 i powtarzałam czynność wirowania trwającą trzy minuty przy 13 200 obr./min. W celu elucji DNA na kolumnę, dodawałam odpowiednią objętość buforu elucyjnego AE (10 mM Tris Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9). W przypadku izolacji DNA z pojedynczych cebulek włosowych, suchych pozostałości tkanek miękkich pobranych z poroży i żuchw dodawałam 100 µl buforu AE, podczas gdy do materiał pobranego w postaci mięśni – 150 µl buforu AE. Elucja w buforze AE gwarantuje optymalne, długotrwałe przechowywanie i stabilność DNA. W kolejnym etapie inkubowałam próby w temperaturze pokojowej przez minutę, a następnie przez kolejną minutę wirowałam przy 8 000 obr./min. Wyizolowany DNA, zgodnie z rekomendacją, przechowywałam do czasu analiz w temperaturze -20°C.

Izolacja DNA z odchodów

Odchody zebrane w terenie, do momentu analiz w laboratorium przeprowadzonych zgodnie z protokołem firmy Qiagen do izolacji DNA z odchodów człowieka, były zabezpieczone w temperaturze -20°C. Po pobraniu fragmentu odchodów, około 180 – 220 mg, do każdej próby dodałam 1 600 µl trawiącego buforu ASL. Następnie próby poddałam wytrząsaniu i wirowaniu przez minutę przy 13 200 obr./min. Do odwirowanego supernatantu dodałam po jednej tabletki InhibitEX i po minutowym wytrząsaniu, próby inkubowałam w temperaturze pokojowej przez 1 minutę. W tym czasie zawarta w tabletkach InhibitEX żywica i zoptymalizowany bufor adsorbowały inhibitory PCR obecne w materiale. Po trzech minutach wirowania przy 13 200 obr./min., supernatant oddzielony od osadu związanego z inhibitorami ponownie poddałam takim samym warunkom wirowania, jak w poprzednim etapie. Następnie, do każdej próby dodałam po 25 µl proteinazy K, 600 µl buforu AL i poddałam 10-minutowej inkubacji w temperaturze 70°C (Thermo Shaker TS-100, Biosan). W kolejnym etapie dodałam po 600 µl 96% alkoholu etylowego i przenosiłam lizat w trzech turach po 600 µl na kolumny ze złożem krzemionkowym, poddając je wirowaniu przez minutę przy 13 200 obr./min. Następnie nanosiłam po 500 µl buforu płuczającego AW1 i AW2 do każdej kolumny, odwirowując próby, odpowiednio najpierw przez minutę, a potem przez trzy minuty przy 13 200 obr./min. W celu wypłukania DNA ze złoża krzemionkowego dodałam, w zależności od stanu odchodów znalezionych w terenie, od 80 do 120 µl buforu AE, a następnie poddałam próby inkubacji trwającej minutę w temperaturze pokojowej, zakończonej minutowym wirowaniem przy 13 200 obr./min. Przesącz z kolumny zawierający DNA do czasu analiz przechowywałam w temperaturze -20°C.

Kategorie użytych markerów genetycznych

W zaplanowanych badaniach wykonałam analizy z użyciem trzech różnych kategorii markerów genetycznych:

- (1) mitochondrialnego DNA,
- (2) markerów zlokalizowanych na chromosomach płci: Y i X,
- (3) loci autosomalnych (mikrosatelitarny DNA i gen *MHC II DRB*).

Mitochondrialny DNA (mtDNA)

Badania z zakresu genetyki populacyjnej i filogeografii zwierząt często opierają się na analizach mitochondrialnego DNA. Genom mitochondrialny u większości gatunków jest niemal zawsze przekazywany następnym pokoleniom przez gamety żeńskie i rzadko, jeśli w ogóle, podlega rekombinacji (Awise 2008). Zwierzęcy mtDNA, z kilkoma wyjątkami, jest kolistą cząsteczką o długości 15 – 20 kpz, zawierającą, np. u ssaków blisko 40 genów, z których około połowa koduje RNA rybosomowy lub transportujący wykorzystywany w procesie syntezy białek, natomiast pozostałe geny kodują białka biorące udział w transporcie elektronów lub fosforylacji oksydacyjnej. Układ genów w zwierzęcym mtDNA jest ewolucyjnie konserwatywny, chociaż często w celu odróżnienia taksonów wyższej rangi wykorzystywane są różnice w składzie lub kolejności genów. Część sekwencji mtDNA ewoluuje bardzo szybko w porównaniu z genami genomu jądrowego, głównie w związku z niewydajnym mechanizmem naprawczym (Brown i wsp. 1979; Wilson i wsp. 1985), dlatego mtDNA może być wykorzystywany do analizy struktury i historii ewolucyjnej populacji oraz odtwarzania przebiegu kierunków kolonizacji (Stoneking i wsp. 1991).

Region kontrolny mtDNA (ang. control region, mtDNA-cr)

W analizach wewnątrzgatunkowej zmienności mtDNA najczęściej wykorzystywany jest najbardziej zmienny jego fragment, mianowicie region kontrolny, o długości około jednego tysiąca par zasad, który powieliłam w łańcuchowej reakcji polimerazy z wykorzystaniem trzech par starterów (Tabela 3). Wykorzystując startery zaprojektowane przez Hundertmarka i wsp. (2002a) – LGL283 i ISM015, namnożyłam odcinek mtDNA-cr o długości 607 par zasad. Do amplifikacji DNA wyizolowanego z żuchw łośi odstrzelonych w latach 1987 – 1994, w przypadku których nie dysponowałam odpowiednią ilością DNA lub był on zdegradowany, zaprojektowałam przy pomocy programu FastPCR (Kalendar i wsp. 2009) parę starterów CRS2-F (*forward*) i CRS2-R (*reverse*; Tabela 3). Startery te umożliwiły mi powielenie w reakcji PCR fragmentu mtDNA-cr o długości 351 par zasad. Aby uzyskać produkt reakcji PCR w przypadku DNA wyizolowanego z trofeów łowieckich i zrzutów, który był w znacznym stopniu zdegradowany, zaprojektowałam w programie FastPCR kolejną parę starterów – CR 237-F

(*forward*) i CR 237-R (*reverse*; Tabela 3), dzięki którym namnożyłam odcinek mtDNA-cr o długości 237 par zasad.

Cytochrom b mtDNA (cytb mtDNA)

Zmienność sekwencji genu cytochromu *b*, którego tempo ewolucji jest wolniejsze niż w przypadku mtDNA-cr, jest powszechnie wykorzystywana w badaniach filogenezy i filogeografii ssaków (Irwin i wsp. 1991; Hundertmark i Bowyer 2004). Korzystając z sekwencji starterów ML103 i MH104 (Tabela 3), zaprojektowanych przez Chikuni i wsp. (1995), powieliłam w reakcji PCR sekwencję całego genu cytochromu *b* mtDNA o długości 1140 par zasad u 20 łosi reprezentujących wszystkie haplotypy mtDNA-cr stwierdzone w niniejszych badaniach. Uzyskane sekwencje połączyłam następnie z sekwencjami mtDNA-cr, otrzymując odcinki mtDNA o długości 1747 par zasad, które wykorzystałam do konstrukcji drzewa filogenetycznego linii mtDNA w programie Mega v.5.05 (Tamura i wsp. 2011).

Markery zlokalizowane na chromosomach Y i X

Chromosom Y, szczególnie w ostatnim dziesięcioleciu, poddawany był licznym badaniom, których celem było uzyskanie informacji na temat historii ewolucyjnej współczesnych ludzi (Hill i wsp. 2000; Semino i wsp. 2000; Underhill i wsp. 2000). Analiza markerów znajdujących się na niepodlegającym rekombinacji chromosomie Y, wykorzystywana jest bowiem do wykrywania rozmieszczenia męskich linii ewolucyjnych i do oceny relatywnego udziału samców w kształtowaniu struktury populacji (Hellborg i Ellegren 2003). Jak podają Autorzy (2003), informacje na temat otrzymanych haplotypów są dobrym uzupełnieniem danych uzyskanych dla markerów identyfikujących linie matczyne u samic w mtDNA, a także po porównaniu z dywergencją genów jądrowych i mitochondrialnych, mogą być wykorzystane do oceny stopnia dyspersji samców. Mimo iż markery zlokalizowane na chromosomie Y są cenne w badaniach molekularnych i ekologicznych, istnieją ogromne problemy z ich zastosowaniem i identyfikacją. Hellborg i Ellegren (2003) zaprojektowali pary starterów docelowo przeznaczone do powielania sekwencji markerów, nazwanych YCATS, zlokalizowanych na chromosomie Y u różnych gatunków ssaków. Geny *DBY* i *UTY* u człowieka położone są w niepodlegającym rekombinacji (*NRY*) i specyficznym dla samców (*MSY*) regionie

chromosomu Y (Lahn i wsp. 2001; Skaletsky i wsp. 2003). Uniwersalne startery zostały przeze mnie wykorzystane do powielenia u łośi genów: *DBY4*, *DBY7*, *DBY8*, *DBY9*, *DBY14*, *UBE1Y6*, *UTY5* i *UTY11* (Tabela 3), dla których w populacjach sarny i/lub renifera Hellborg i Ellegren (2003) otrzymali czytelne sekwencje obejmujące introny, jak i flankujące egzony. Produkt reakcji PCR otrzymałam w przypadku genów *DBY4* (214 pz), *DBY7* (265 pz), *DBY8* (138 pz), *DBY9* (418 pz), *DBY14* (296 pz) i *UTY11* (545 pz), produktu nie uzyskałam natomiast dla *UBE1Y6* i *UTY5*. Po stwierdzeniu polimorfizmu w genach *DBY9* i *DBY14* zaprojektowałam w programie FastPCR startery specyficzne dla łośia, nazwane przeze mnie *DBY9_alcesF* (*forward*) i *DBY9_alcesR* (*reverse*) oraz *DBY14_alcesF* (*forward*) i *DBY14_alcesR* (*reverse*; Tabela 3), które umożliwiły mi powielenie fragmentów o długości odpowiednio 194 par zasad i 154 par zasad dla tych genów oraz weryfikację wcześniej wykrytych polimorfizmów z użyciem starterów uniwersalnych. Szczegółowym analizom poddałam gen *DBY14*, który amplifikowałam w 14 populacjach łośi z Polski, spośród których cztery utworzone były przez samce zastrzelone w latach 1987 – 1994 (Tabela 9), w jednej populacji z Litwy oraz u pięciu byków pochodzących z Białorusi ($N = 1$), Finlandii ($N = 1$), Szwecji ($N = 1$) i Syberii ($N = 2$).

Za determinację płci męskiej i ściśle wyznaczenie sposobu dziedziczenia w linii ojcowskiej u ssaków odpowiedzialny jest przede wszystkim gen *SRY* (Nishida i wsp. 2003). Gen *SRY* koduje białka z grupy HMG (ang. *high mobility group*) związane z wykształceniem wiązań i prawidłowym skręceniem nici DNA. W związku z tym, przypisuje mu się rolę czynnika transkrypcyjnego. Badania przeprowadzone wśród różnych grup ssaków wskazują na jego zmienne tempo ewolucji, u naczelnych i gryzoni (Tucker i Lundrigan 1993; Whitfield i wsp. 1993) tempo to jest znacznie szybsze niż w przypadku domowych przeżuwaczy (Payen i Cotinot 1994). Do powielenia odcinka genu *SRY* o długości 472 par zasad wykorzystałam utworzoną w programie FastPCR parę starterów, którą nazwałam *SRY_alcesF* (*forward*) i *SRY_alcesR* (*reverse*; Tabela 3). Do zaprojektowania tych starterów wykorzystałam sekwencje genu *SRY* u jeleniowatych (Ludt i Kuehn 2006, dane niepubl.) dostępne w GenBanku (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) dla: *A. alces* (GenBank nr DQ888680), *C. elaphus* (GenBank nr DQ888692), *D. dama* (GenBank nr DQ888701) i *C. capreolus* (GenBank nr DQ888700).

Chromosom X u ssaków jest bardzo konserwatywny pod względem rozmiaru i zlokalizowanych na nim genów (Ohno 1973). Do zaprojektowania starterów potrzebnych do powielenia fragmentu intronu genu *Zfx* u łośi wykorzystałam sekwencje genu *Zfx* (Han i wsp. 2006, dane niepubl.) dostępne w GenBanku dla *C. elaphus* (GenBank nr DQ415950), *C. capreolus bedfordii* (GenBank nr DQ415951) i *Bos taurus* (GenBank nr DQ415953). Startery *Zfx_cervidF* (*forward*) i *Zfx_cervidR* (*reverse*; Tabela 3), zaprojektowane przeze mnie w programie FastPCR, umożliwiły powielenie odcinka intronu genu *Zfx* o długości 523 par zasad u 12 samic i 13 samców. W przypadku samców wystąpiły problemy z odczytem elektroforegramu, ponieważ jednocześnie sekwencjonował się fragment genu *Zfy* o długości 700 par zasad. Różnicę w wielkości powielonych odcinków obu genów, która wynosiła 177 par zasad, wykorzystałam do elektroforetycznego rozdziału amplifikowanych produktów reakcji PCR w 2% żelu agarozowym (Reducta, Prona). Po trwającej 2,5 godziny elektroforezie wycinałam skalpelem fragment żelu, w którym znajdował się fragment intronu genu *Zfx*. Następnie żel agarozowy z tym fragmentem rozpuszczałam w 100 µl wody destylowanej i podgrzewałam przez 5 minut w temperaturze 60°C w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Procedura ta umożliwiła mi wypłukanie z żelu powielonego odcinka intronu genu *Zfx*, który posłużył z kolei jako matryca DNA do przeprowadzenia powtórnej reakcji PCR z wykorzystaniem tych samych starterów. W ten sposób powieliłam wyłącznie DNA odpowiadający fragmentowi intronu genu *Zfx* u samców.

Mikrosatelitarny DNA

Mikrosatelitarny DNA stanowią krótkie, powtarzające się od 10 do 30 razy sekwencje złożone z 2 – 4 nukleotydów, losowo rozmieszczone w genomie (Goldstein i Schlötterer 2000). Charakteryzują się one znacznym polimorfizmem liczby powtórzeń danego motywu (Zhang i Hewitt 2003). Analizy mikrosatelitarnego DNA są szeroko wykorzystywane do identyfikacji osobników, a także do określenia parametrów wewnątrzpopulacyjnej zmienności genetycznej i wyznaczania pokrewieństwa genetycznego między osobnikami. Mikrosatelitarny DNA jest narzędziem z powodzeniem stosowanym do określania zróżnicowania między populacjami i poziomu przepływu genów między nimi. Na potrzeby analiz laboratoryjnych przetestowałam 38 par loci mikrosatelitarnych znakowanych fluorescencyjnie (Tabela 4). Wykorzystane przeze mnie

sekwencje starterów zaczerpnęłam z badań mikrosatelitarnego DNA u parzystokopytnych. Procedura znakowania starterów przeprowadzana była przez firmę Life Technologies. Znakowany był tylko starter *forward* na końcu 5' z wykorzystaniem jednego z czterech komercyjnych barwników: *FAM* (niebieski), *NED* (czarny), *PET* (czerwony) i *VIC* (zielony). W przypadku ośmiu testowanych loci: BM861, MM12, INRA124, INRA189, INRA35, IOBT965 i UMN2001 nie stwierdziłam produktu reakcji PCR. Mimo iż w przypadku pozostałych 30 loci otrzymałam produkt reakcji PCR, to w analizach nie uwzględniłam tych, które dawały niepowtarzalne odczyty genotypów (BM2830, CelJP15 i Haut14), były monomorficzne (BMC1009), posiadały zaledwie dwa (OarFCB304, NVHRT01 i TGLA53) lub trzy allele (BM888, BovirBP i McM130), spośród których jeden występował z bardzo wysoką frekwencją. Zrezygnowałam również z tych loci, które dawały odczyt w postaci pików o bardzo niskim sygnale dla poszczególnych alleli (INRA003, NVHRT24, OarFCB20, RT23, RT9, RT24, RT27 i UMN2404) oraz tych, które charakteryzowały się obecnością dużej liczby alleli zerowych (BL42 i CSM003).

W ten sposób wybrałam 11 loci, które pozwoliły mi uzyskać najbardziej czytelne odczyty genotypów, rozumiane jako odpowiednia wysokość poszczególnych pików alleli (ang. *peak height*), dawały powtarzalne i jednoznaczne odczyty oraz charakteryzowały się najwyższą liczbą alleli. Loci te amplifikowałam w dwóch panelach PCR: panel I złożony z 6 loci mikrosatelitarnych i panel II, w którym znalazło się 5 loci mikrosatelitarnych (Tabela 5). Genetyczną identyfikację płci badanych osobników przeprowadziłam dzięki wkomponowaniu w panel II genu *SRY*. Do powielenia tego odcinka genu wykorzystałam startery wcześniej zaprojektowane do powielenia sekwencji genu *SRY*, spośród których starter *forward* został komercyjnie znakowany barwnikiem fluorescencyjnym na końcu 5'.

Gen MHC II DRB

Geny głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) wykazują bardzo wysoki stopień polimorfizmu genetycznego u wielu gatunków kręgowców (Klein 1986), co wskazuje na rolę doboru naturalnego w kształtowaniu zmienności genów MHC (Aguilar i wsp. 2004). Podstawową funkcją genów MHC jest prezentacja obcych białek limfocytom *T*, a im większa zmienność białek MHC w miejscach wiążących antygen, tym szersze spektrum rozpoznawanych patogenów. Kompleks genów MHC składa się z kilku regionów: MHC klasy I, MHC klasy II oraz

MHC klasy III. Geny MHC klasy II, obok genów MHC klasy I należą do najbardziej zmiennych genów kręgowców (Garrigan i Hedrick 2003). Zmienność ta związana jest zarówno z liczbą alleli przypadających na dany locus, w niektórych przypadkach może ona przekraczać setki, jak i z liczbą samych loci występujących w danym organizmie. W dotychczas przeprowadzonych badaniach kompleksu MHC II u łośi wykorzystany był gen *DRB*, który jest najbardziej zmiennym genem kompleksu MHC II u ludzi i bydła (Marsh i Bodmer 1990; Andersson i wsp. 1991). Badania zmienności genu *MHC II DRB* w populacjach łośia w Europie i Ameryce Północnej (Mikko i Andersson 1995; Ellegren i wsp. 1996; Udina i wsp. 2002) wykazały niski poziom polimorfizmu, przy wyraźnym zróżnicowaniu między populacjami (Wilson i wsp. 2003). W swojej pracy zbadalam zmienność fragmentu genu *DRB* drugiego egzonu MHC klasy II o długości 226 par zasad u 245 osobników łośi, wykorzystując do przeprowadzenia reakcji amplifikacji sekwencje starterów opracowane przez Mikko i Andersson (1995; Tabela 3).

Amplifikacja wybranych genów metodą PCR

Do namnożenia w wyizolowanym DNA poszczególnych genów stosowałam łańcuchową reakcję polimerazy. Producentem odczynników, które zastosowałam w tej reakcji była głównie firma Qiagen, z wyjątkiem oligonukleotydów nieznakowanych fluorescencyjnie (Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN) i znakowanych fluorescencyjnie (Life Technologies).

Reakcję PCR dla wszystkich badanych genów przeprowadziłam w objętości 5 µl w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Mieszaninę reakcyjną dla przykładowych 8 prób uzyskałam przez wymieszanie 13,5 µl Taq Master Mix (Qiagen) z 7,9 µl wody destylowanej (Qiagen) oraz 2,6 µl mieszaniny starterów – 0,052 µl każdego ze starterów (100pmol/µl). Do każdej z prób aplikowałam po 3 µl mieszaniny reakcyjnej oraz po 2 µl wyizolowanego wcześniej DNA. Taq PCR Master Mix zawierał termostabilną polimerazę Taq (HotStarTaq DNA Polymerase), bufor reakcyjny (50 mM KCl; 10 mM Tris HCl pH 9,0; 0,1% Triton X – 100), jony MgCl₂ w stężeniu 1,5 mM oraz wolne trifosforany nukleotydów (dNTP), każdy o stężeniu 200 µM. Do powielenia loci mikrosatelitarnego DNA zastosowałam wariant reakcji PCR, tzw. PCR multipleksowy (ang. *PCR multiplex*), który umożliwia jednoczesną amplifikację wielu,

różnych sekwencji DNA w jednej fiołce, poprzez użycie więcej niż jednej pary starterów. Podczas pojedynczej reakcji mogłam więc każdorazowo amplifikować 6 loci mikrosatelitarnych (panel I) lub 5 loci i gen *SRY* (panel II) u analizowanych osobników (Tabela 5).

Reakcje namnożenia poszczególnych genów przeprowadziłam według jednego z trzech zastosowanych w niniejszej pracy profili PCR (Tabela 3). Profil A obejmował 15 minut wstępnej denaturacji w temperaturze 95°C oraz 35 cykli (40 w przypadku DNA wyizolowanego z odchodów, poroży i żuchw) przebiegających według schematu: denaturacja w temperaturze 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 57°C przez 90 sekund oraz elongacja trwająca 60 sekund w temperaturze 72°C. Końcowa faza wydłużania odcinków DNA przebiegała przez 30 minut w temperaturze 60°C. Profil B zakładał te same etapy, jak profil A, z tą tylko modyfikacją, że przyłączanie starterów przebiegało przez 90 sekund w temperaturze 50°C. Dla profilu C zastosowałam następujący schemat reakcji PCR: wstępna denaturacja w temperaturze 95°C przez 15 minut oraz 35 cykli, na które składała się denaturacja przebiegająca w temperaturze 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 55°C trwające 30 sekund, wydłużanie w 72°C przez 30 sekund oraz końcowe wydłużanie w 72°C przez 3 minuty. Po zakończeniu każdego z zastosowanych profili, próby do momentu wyjęcia z termocyklera przechowywane były w temperaturze 16°C.

Podczas nastawiania reakcji PCR korzystałam ze sprzętu dostępnego w Laboratorium Biologii Molekularnej, między innymi wirówek firmy Eppendorf: Centrifuge 5804 (rotor F-45-48-PCR max 12 000 obr./min.) i Centrifuge 5415D (rotor F45-24-11 max 13 200 obr./min.).

Elektroforetyczną kontrolę jakości produktów reakcji PCR przeprowadzałam w aparacie firmy Clever (Scientific Ltd) przy wykorzystaniu żelu agarozowego o stężeniu 1,5%, stosując agarozę Basica LE GQT (Prona) w 10x stężonym buforze TBE (Tris, kwas borowy, EDTA) oraz bromek etydyny (2µl/100ml), który dodany do żelu wbudowuje się między zasady DNA. Obecność lub brak uzyskanych fragmentów DNA stwierdzałam w świetle UV (przy długości fali 312 nm) stosując transilluminator (Herolab UVT-20M). Wielkość fragmentów DNA oceniałam względem markera FastRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas), który charakteryzuje się obecnością 5 fragmentów o wielkościach odpowiednio: 1 500 pz, 850 pz, 400 pz, 200 pz i 50 pz.

Oczyszczanie DNA po reakcji PCR przed sekwencjonowaniem

Oczyszczanie produktu po reakcji PCR z pozostałości enzymatycznych, mianowicie starterów i wolnych deoksynukleotydów (dNTP) przeprowadziłam tylko dla sekwencji cytochromu *b* mtDNA z wykorzystaniem dwóch enzymów (Fermentas): exonukleazy I (Exo I, *E. coli*) i alkalicznej fosfatazy z krewetek (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP). Enzym Exo I degradowuje jednoniciowe fragmenty DNA, oczyszczając mieszaninę reakcyjną z niewykorzystanych w reakcji PCR starterów, natomiast SAP usuwa wolne deoksynukleotydy, które mogłyby zmienić stosunek ddNTP/dNTP w reakcji sekwencyjnej. Mieszaninę przygotowaną z 0,5 µl Exo I (20u/µl) i 1 µl SAP (1u/µl) dodawałam do 5 µl produktu PCR, by następnie inkubować otrzymaną mieszaninę reakcyjną w 37°C przez 15 minut. Inaktywację enzymów, trwającą kolejne 15 minut, przeprowadzałam w temperaturze 85°C.

Reakcja sekwencjonowania DNA

Do przeprowadzenia reakcji sekwencjonowania, pozwalającej określić kolejność nukleotydów w danym fragmencie DNA, wykorzystywałam mieszaninę reakcyjną składającą się w przeliczeniu na jedną próbę z: 1 µl skoncentrowanego buforu reakcyjnego BDT (Life Technologies), 1 µl mieszaniny reakcyjnej BDT v3.1 zawierającej znakowane nukleotydy i polimerazę DNA (Life Technologies), 1 µl rozcieńczonego primera (*forward* lub *reverse*) o stężeniu 3,2 pmol, 5 µl wody destylowanej (Qiagen) oraz 2 µl albo oczyszczonego produktu PCR (cytochrom *b* mtDNA) albo bezpośrednio produktu reakcji PCR zawierającego namnożony fragment DNA (pozostałe analizowane geny). Dla każdego osobnika, u którego badałam gen cytochrom *b* mtDNA, przeprowadziłam po dwie reakcje sekwencjonowania, z wykorzystaniem obu starterów (*forward* i *reverse*). Do sekwencjonowania pozostałych genów używałam wyłącznie startery *forward*. Reakcja sekwencjonowania przebiegała z zachowaniem następujących parametrów profilu sekwencjonowania: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 3 minuty, a następnie 25 cykli złożonych z denaturacji w 94°C trwającej 30 sekund, przyłączenia startera w 50°C przez 15 sekund i elongacji w 60°C przez 4 minuty.

Usuwanie nieprzyłączonych terminatorów po reakcji sekwencyjnej

Usuwanie nieprzyłączonych, znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów (ddNTP) po reakcji sekwencjonowania, które uniemożliwiałyby poprawny odczyt sekwencji DNA, przeprowadziłam przy użyciu komercyjnego zestawu ExTerminator (A&A Biotechnology). Zestaw ten opiera się na precypitacji produktów reakcji sekwencyjnej na powierzchni odpowiedniej membrany. Do mieszaniny sekwencyjnej dodawałam 5 µl odczynnika Mix Blue, ułatwiającego kontrolę procesu precypitacji oraz 100 µl roztworu wiążąco-płuczącego. Mieszaninę nanosiłam następnie na kolumnę wyposażoną w specjalną membranę i wirowałam przez 30 sekund przy 4 000 obr./min. W kolejnym etapie usuwałam zanieczyszczenia poprzez płukanie 400 µl roztworu wiążąco-płuczącego i wirowanie (13 200 obr./min., 2 min.). Oczyszczone produkty reakcji sekwencyjnej wypłukiwałam bezpośrednio w 28 µl sterylnej, podwójnie destylowanej H₂O, a po inkubacji w temperaturze pokojowej trwającej dwie minuty próby wirowałam (13 200 obr./min., 1 min.), otrzymując eluat zawierający oczyszczony produkt reakcji sekwencyjnej, gotowy do denaturacji termicznej w sekwenatorze kapilarnym.

Elektroforeza produktów sekwencjonowania i analiza sekwencji nukleotydowych

Sekwencje genów mtDNA, MHC i zlokalizowanych na chromosomach Y i X

Materiał oczyszczony z pozostałości sekwencyjnego PCR poddawałam elektroforezie i bezpośredniej analizie w 4-kapilarnym, automatycznym sekwenatorze ABI 3130 Avant (Applied Biosystems), będącym na wyposażeniu Laboratorium Biologii Molekularnej Instytutu Biologii UwB. Do odczytu, dopasowywania i wyrównania (ang. *alignment*) sekwencji wykorzystywałam ogólnodostępne oprogramowanie komputerowe: Chromas Lite v.2.01 (Technelysium Pty Ltd, 2005) i BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1. (Hall 1999).

Rozdział produktów Multiplex-PCR (loci mikrosatelitarnego DNA)

Przed aplikacją prób na automatyczny sekwenator DNA, przeprowadziłam ich denaturację. Mieszanina denaturująca w przeliczeniu na jedną próbę zawierała 10 µl HI-DI

Formamide (amid kwasu mrówkowego, Life Technologies) oraz 0,5 µl standardu wielkości (Gene Scan – 500 Liz, Life Technologies). Do każdej z prób zaaplikowałam po 10,2 µl mieszaniny oraz po 1 µl produktu PCR. Tak przygotowane próby poddawałam denaturacji przez 5 minut w temperaturze 95°C, po czym schładzałam w żelach chłodzących. Przy pomocy programu GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems) dokonałam zarówno manualnego, jak i automatycznego dopasowania alleli w poszczególnych loci. Loci mikrosatelitarne poddałam tzw. binowaniu, rozumianemu jako definiowanie alleli. W programie GeneMapper v.4.0 stworzyłam dwa panele mikrosatelitarne odpowiadające panelom wykorzystanym w reakcji Multiplex-PCR. W zaprojektowanych panelach, dla poszczególnych loci mikrosatelitarnych, zdefiniowałam znacznik fluorescencyjny i ich zakres wyrażony w parach zasad. Referencyjne dane, rozumiane jako wybrane osobniki, u których amplifikowane loci dawały jednoznaczne i najbardziej czytelne odczyty, wykorzystałam do wygenerowania referencyjnych alleli w analizowanych loci. Dodając kolejne osobniki do tak zaprojektowanych paneli oznaczyłam ich genotypy.

ANALIZY STATYSTYCZNE

Ocena poziomu błędów w genotypowaniu

Istnieje szereg potencjalnych błędów zachodzących niekiedy w trakcie identyfikowania profili osobników, które mogą wpłynąć na otrzymany wynik i w konsekwencji skutkować błędnie przeprowadzoną analizą. Problemem, który zwykle pojawia się jako pierwszy, jest wielkość populacji uwzględniona w analizach. Idealnie jest, gdy jest ona nie mniejsza niż 30 osobników (Ratkiewicz 2006). Zbyt mała liczba prób pochodzących z populacji w stosunku do całej populacji prowadzi do obarczonych sporym błędem oszacowań frekwencji haplotypów/alleli. Należy też pamiętać, że wielkość populacji powinna również uwzględniać zmienność w badanym locus. Kolejnym źródłem błędów jest nieświadome pobranie prób z więcej niż jednej zakładanej populacji. Wyznaczenie ścisłych granic dla populacji, szczególnie w przypadku dużych mobilnych ssaków, jest problematyczne i takie granice mogą mieć często charakter wyłącznie umowny. Połączenie prób z ≥ 2 populacji, w których występują różne frekwencje alleli,

może skutkować, tzw. efektem Wahlunda (1928), w wyniku którego proporcja homozygot w całej próbie będzie większa, niż wynikałoby z analiz przeprowadzonych osobno dla poszczególnych populacji. Taki rezultat może nas skłonić do błędnego wnioskowania, że badana populacja nie znajduje się w równowadze Hardy'ego-Weinberga (*HWE*). Natomiast analizy wykonane oddzielnie dla poszczególnych populacji mogłyby pozwolić zidentyfikować ≥ 2 populacje znajdujących się w równowadze *HWE*.

Identyfikacja genotypów osobników, czy to w przypadku sekwencji nukleotydowych, czy loci mikrosatelitarnych, obarczona jest również ryzykiem błędnego oznaczenia genotypu, dlatego konieczne jest powtórzenie 5% – 10% losowo wybranych osobników. Dla wszystkich analizowanych kategorii markerów powtórzyłam analizy laboratoryjne dla przypadkowo 5% wybranych osobników. W trakcie odczytywania sekwencji generowane są błędy specyficzne dla sekwencji, które są zwykle manualnie weryfikowane, a wśród których najczęstsze to insercje, delecje oraz niedopasowanie sekwencji (Lawrence i Solovyev 1994). Uniwersalne startery mogą również generować fałszywe polimorfizmy, których obecność lub wykluczenie można potwierdzić projektując startery specyficzne dla gatunku. Na potrzeby analiz stworzyłam sześć par starterów specyficznych dla łośia (Tabela 3).

Loci mikrosatelitarne, mimo że są szeroko wykorzystywane w analizach wewnątrz- i międzypopulacyjnych, również generują charakterystyczne dla siebie błędy, które decydują o genotypie identyfikowanego osobnika. Jednym z najczęstszych błędów są tak zwane allele zerowe (ang. *null alleles*), które wpływają na pozorne wykrywanie nadmiaru homozygot z większą częstością, niż wynikałoby to z frekwencji obecnych w populacji alleli. Allele zerowe nie są poddawane amplifikacji w trakcie reakcji PCR. Jedną z najczęstszych przyczyn tego zjawiska są mutacje zachodzące w obrębie jednej lub obu sekwencji hybrydujących ze starterami. Jeśli amplifikacji ulegnie tylko jeden allel u osobnika heterozygotycznego, to zostanie on błędnie sklasyfikowany jako homozygota. Częstym błędem są także tak zwane allele „jąkały” (ang. *stuttering*), które wynikają z nieznacznych zmian w wielkości alleli, zachodzących w trakcie reakcji PCR. Brak amplifikacji dużych alleli (ang. *large allele drop-out*), to kolejny przykład błędów, wynikający z faktu, że allele złożone z większej liczby powtórzeń nie ulegają amplifikacji tak wydajnie jak małe allele.

W programie Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout i wsp. 2004) zidentyfikowałam możliwe błędy, które pojawiły się w analizach mikrosatelitarnego DNA, stosując 1 000 symulacji zgodnie z algorytmem Monte Carlo. Na podstawie otrzymanych wyników wykonanych dla 13 wybranych i powielonych loci mikrosatelitarnych postanowiłam do analiz nie włączać loci BL42 i CSM003.

Zmienność genetyczna populacji bazująca na sekwencjach nukleotydowych

Parametry zmienności sekwencji DNA wykorzystane w niniejszej pracy to:

- Liczba haplotypów (Nh).
- Frekwencja haplotypów.
- Różnorodność haplotypowa (h), biorąca pod uwagę informacje o liczbie i częstości różnych alleli danego locus w populacji i obliczana ze wzoru (Nei 1987):

$$h = 1 - \sum x_i^2,$$

gdzie: x_i – częstość haplotypu i .

- Różnorodność nukleotydowa (π), opisująca średnią liczbę różnic na pozycję nukleotydową między dwiema losowo wybranymi sekwencjami i definiowana wzorem (Nei i Li 1979):

$$\pi = \sum x_i x_j x \pi_{ij},$$

gdzie: x_i i x_j – frekwencje haplotypów w populacji,

π_{ij} – liczba różnic w przeliczeniu na jedną parę zasad między sekwencjami i i j .

- Liczba polimorficznych miejsc nukleotydowych (S ; Watterson 1975; Tajima 1989), rozumiana jako liczba miejsc polimorficznych wśród n sekwencji DNA.
- Średnia liczba różnic między porównywanymi parami sekwencji nukleotydowych (N_{MR}).

Aby sprawdzić, czy sekwencje mtDNA, *MHC II DRB* i zlokalizowane na chromosomie Y wykazują ślady działania doboru przeprowadziłam następujące testy: D (Tajima 1989), D^* (Fu i Li 1993) oraz F_s (Fu 1997).

Testy neutralności sekwencji DNA bazują na modelu, w którym porównywane są różne, oparte o inne estymatory zmienności sekwencji, oszacowania parametru theta (θ). Dla loci autosomalnych $\theta = 4Ne\mu$, natomiast w przypadku markerów haploidalnych $\theta = 2Ne\mu$, gdzie Ne to efektywna wielkość populacji, μ – tempo mutacji/sekwencję/pokolenie. W oparciu o założenie neutralności sekwencji względem doboru (Kimura 1983), nie powinno być istotnych statystycznie różnic między poszczególnymi oszacowaniami, o ile badane populacje znajdują się w równowadze pomiędzy działaniem dryfu genetycznego, a mutacjami.

- Statystyka D oparta jest na różnicach pomiędzy liczbą miejsc segregujących (θ_s), a średnią wartością różnorodności nukleotydów (θ_π) i definiowana jest wzorem:

$$D = \frac{\theta_\pi - \theta_s}{\sqrt{\text{Var}(\theta_\pi - \theta_s)}}$$

Dodatnie wartości statystyki D mogą wskazywać na działanie doboru stabilizującego, natomiast ujemne mogą świadczyć o działaniu doboru oczyszczającego. Istotne wartości współczynnika D mogą być także efektem działania takich czynników, jak różne tempo mutacji, ekspansja populacji, czy też efekt wąskiego gardła, po którym populacja nie osiągnęła jeszcze równowagi.

- Statystyka D^* , stanowiąca analogiczną miarę do statystyki D , opiera się na porównaniu wartości θ_s oraz liczby mutacji występujących tylko w jednej sekwencji (ang. *singletons*, θ_η).
- Statystyka F_s oparta jest na rozkładzie frekwencji haplotypów warunkowanym wartością θ i definiowana jest wzorem:

$$F_s = \ln\left(\frac{S}{1-S}\right)$$

Test F_s jest wrażliwy na ekspansję demograficzną populacji, co w wielu przypadkach skutkuje dużymi wartościami ujemnymi testu.

Testy przeprowadziłam w programach DnaSP v.5 (Librado i Rozas 2009) i Arlequin v.3.11 (Excoffier i wsp. 2006). Istotność statystyczną oceniłam zgodnie z algorytmem Hudsona i wsp. (1992) wykonując 1 000 symulacji.

Parametry mierzące zróżnicowanie genetyczne między populacjami dla sekwencji nukleotydowych

Zróżnicowanie genetyczne między parami porównywanych populacji określiłam korzystając z programu Arlequin v.3.11. Wyliczyłam współczynnik genetyczny Φ_{ST} wykorzystywany do empirycznego oszacowania i testowania wartości zróżnicowania genetycznego populacji w przypadku sekwencji, który bazuje na liczbie różnic nukleotydowych i współczynnik F_{ST} , mierzący wariancję we frekwencji haplotypów między populacjami. Istotność statystyczną współczynników testowałam stosując 1 000 permutacji i uwzględniając poprawkę Bonferroniego.

Do oceny stopnia zróżnicowania genetycznego populacji wykorzystałam skalę Wrighta (1978):

- $\Phi_{ST} < 0,05$ małe zróżnicowanie genetyczne między populacjami,
- $0,05 < \Phi_{ST} < 0,15$ średnie zróżnicowanie genetyczne między populacjami,
- $0,15 < \Phi_{ST} < 0,25$ duże zróżnicowanie genetyczne między populacjami,
- $\Phi_{ST} > 0,25$ bardzo duże zróżnicowanie genetyczne między populacjami, świadczące o braku przepływu genów między nimi.

Zmienność genetyczna populacji w loci mikrosatelitarnego DNA

Wskaźniki zmienności genetycznej (polimorfizmu) loci mikrosatelitarnego DNA:

- Frekwencja alleli zerowych (ang. *null alleles*, Goldstein i Schlötterer 2000) wykryta w programie Cervus v.3.0 (Kalinowski i wsp. 2007).
- Średnia liczba alleli (N_A) występujących w poszczególnych loci (FSTAT v.2.9.3 Goudet 1995).
- Bogactwo alleli (A_R), będące współczynnikiem wskazującym średnią liczbę alleli przypadającą na locus z uwzględnieniem wielkości próby (FSTAT v.2.9.3 Goudet 1995).
- Frekwencja alleli – częstość występowania danego allelu w populacji (Cervus v.3.0 Kalinowski i wsp. 2007).
- Liczba alleli prywatnych (N_p) wskazująca liczbę alleli charakterystycznych tylko dla danej populacji.

- Heterozygotyczność obserwowana (H_O), czyli rzeczywisty udział heterozygot występujących w analizowanych populacjach (Cervus v.3.0 Kalinowski i wsp. 2007).
- Heterozygotyczność oczekiwana (H_E), reprezentująca frekwencję heterozygot, której należałoby oczekiwać, jeśli populacja spełnia warunki równowagi Hardy'ego-Weinberga (Cervus v.3.0 Kalinowski i wsp. 2007).

Wartości H_O i H_E wyliczyłam dla każdego locus i dla wszystkich loci razem w całej próbie oraz w analizowanych populacjach. Porównanie tych dwóch parametrów pozwala określić, czy heterozygotyczność w populacji jest istotnie różna od heterozygotyczności wynikającej z założeń prawa Hardy'ego-Weinberga.

- Odchylenia od równowagi Hardy'ego-Weinberga (ang. *Hardy-Weinberg equilibrium, HWE*).

W rzeczywistych populacjach nie można oczekiwać, że wszystkie założenia prawa *HWE* będą spełnione. Wiele dużych, outbredowych populacji spełnia założenia *HWE*, ponieważ efekt mutacji i selekcji jest w nich nieznaczny. Istnieją również populacje, także w przypadku gatunków rozmnażających się płciowo, które nie powinny znajdować się w *HWE*. Testując zgodność danej populacji z tym prawem możemy ocenić, w jakim kierunku populacja odbiega od założeń prawa *HWE*, czy heterozygotyczność jest w niej wyższa, czy może niższa od przewidywanej i w jak dużym stopniu. W programie Genepop v4.0 (Rousset 2008) przetestowałam statystyczne odchylenia od równowagi *HWE* stosując następujące parametry łańcucha Markov'a: 10 000 cykli dememoryzacyjnych, 10 000 serii, 10 000 interakcji w każdej serii.

Współczynniki statystyki F (Wright 1951): F_{ST} , F_{IS} i R_{ST}

- Współczynnik F_{ST} (Wright 1951), opisuje redukcję heterozygotyczności w stosunku do heterozygotyczności oczekiwanej w przypadku losowego krzyżowania na skutek np. selekcji lub dryfu genetycznego i zdefiniowany jest wzorem:

$$F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T,$$

gdzie: H_T – heterozygotyczność całej próby oczekiwana z założeń prawa Hardy’ego-Weinberga,

H_S – średnia heterozygotyczność poszczególnych populacji oczekiwana z założeń równowagi Hardy’ego-Weinberga,

Wartość współczynnika F_{ST} determinuje stopień odchylenia od prawa HWE , bowiem im wyższa jest jego wartość tym odchylenie jest większe. Wartości współczynnika F_{ST} zawierają się w zakresie od 0 do 1. W skrajnym przypadku, gdy F_{ST} wynosi 1, w populacji nie występują heterozygoty. W praktyce współczynnik F_{ST} mierzy genetyczne zróżnicowanie między populacjami i może być interpretowany jako wariancja frekwencji alleli pomiędzy populacjami (Neigel 2002). Do oceny stopnia zróżnicowania genetycznego populacji wykorzystałam skalę Wrighta (1978). Zróżnicowanie genetyczne między poszczególnymi populacjami wyrażone jako współczynnik F_{ST} wyliczyłam w programie Arlequin v.3.11, stosując 10 000 permutacji do wyznaczenia istotnych odchyień od zera otrzymanych wartości.

- Współczynnik R_{ST} (Slatkin 1995), dedykowany do analizy danych mikrosatelitarnych jest definiowany wzorem:

$$R_{ST} = (S - S_W)/S,$$

gdzie: S – podwojona średnia różnic w wielkości alleli pomiędzy wszystkimi parami alleli,
 S_W – podwojona średnia wariancji wielkości alleli w każdej populacji.

Współczynnik R_{ST} zakłada model stopniowych mutacji (ang. *stepwise mutation model*, SMM; Kimura i Ohta 1978), który bardziej odpowiada zmianom zachodzącym w sekwencjach mikrosatelitarnych, niż model nieskończonej liczby alleli (ang. *infinite alleles model*, IAM; Kimura i Crow 1964). Współczynnik R_{ST} traktowany jest jako analog F_{ST} , w porównaniu jednak do F_{ST} uwzględnia również wariancję wielkości alleli (Balloux i Lugon-Moulin 2002). Ujemną stroną stosowania współczynnika R_{ST} jest właśnie jego duża wariancja.

Wartość współczynnika R_{ST} pomiędzy analizowanymi populacjami wyznaczyłam w programie Arlequin v.3.11, a istotność statystyczną R_{ST} uzyskałam dzięki zastosowaniu 10 000 permutacji.

- Współczynnik wsobności (F_{IS} ; Wright 1951) określa stopień wsobności, czyli proporcję heterozygotyczności obserwowanej do oczekiwanej w obrębie populacji, losowość krzyżowania się osobników i zdefiniowany jest wzorem:

$$F_{IS} = (H_S - H_I)/H_S,$$

gdzie: H_I – heterozygotyczność przy obserwowanym kojarzeniu wsobnym populacji. Wartości współczynnika F_{IS} , które mieszczą się w przedziale od -1 do 1, pozwalają ocenić, jak bardzo frekwencja genotypów w populacji odbiega od wartości oczekiwanych wynikających z założeń prawa *HWE*. Nieistotne wartości F_{IS} oraz $F_{IS} = 0$ oznaczają, że populacja znajduje się w równowadze *HWE*. Istotne statystycznie wartości $F_{IS} > 0$ mogą wskazywać na kojarzenia w pokrewieństwie (ang. *inbreeding*), istnienie struktury wewnętrznej w populacji, tzw. efekt Wahlunda (1928), dryf genetyczny, działanie doboru płciowego, fizyczne sprzężenie loci, gdyż w populacji obserwowany jest nadmiar homozygot. Wartości $F_{IS} < 0$ oznaczają, że w populacji występuje nadmiar heterozygot, który może wynikać z selekcji faworyzującej heterozygoty albo być efektem kojarzeń blisko spokrewnionych samic z niespokrewnionymi z nimi samcami.

Stosując statystykę F według Weir'a i Cockerham'a (1984) w programie FSTAT v.2.9.3 (Goudet 1995) wyliczyłam wartości współczynnika F_{IS} dla poszczególnych populacji i dla analizowanych loci mikrosatelitarnych, a istotność odchyień tego parametru od zera testowałam za pomocą 1 000 permutacji. W programie FSTAT wyznaczyłam również 95% przedział ufności (C.I.) dla F_{IS} .

Izolacja przez dystans

Wzór genetyczny populacji, znany jako izolacja przez dystans, wynikający z przestrzennego ograniczenia przepływu genów, jest jednym z powszechnie obserwowanych fenomenów występujących w populacjach naturalnych zwierząt (Jensen i wsp. 2005). Izolacja przez dystans (ang. *Isolation by Distance*, IBD) definiowana jest jako spadek podobieństwa genetycznego między populacjami wraz ze wzrostem dystansu geograficznego, jaki je dzieli. Jednym z programów pozwalających ocenić, czy związek pomiędzy podobieństwem genetycznym (lub odległością) i dystansem geograficznym jest

istotny statystycznie między populacjami jest Isolation by Distance Web Service (IBDWS; Jensen i wsp. 2005). Program ten wykorzystałam do oceny, czy zróżnicowanie genetyczne, zarówno w mtDNA-cr jak i w mikrosatelitarnym DNA między populacjami łośi w Polsce może wynikać z izolacji przez dystans. Matryca zróżnicowania genetycznego (F_{ST}) posłużyła mi do wyznaczenia dystansu genetycznego między parami populacji zgodnie ze wzorem $F_{ST}/(1 - F_{ST})$, natomiast dystans geograficzny określiłam stosując aplikację Google Earth (licencja: Data SIO, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO, 2013 Map Link/Tele Atlas, US Dept of State Geographer). Istotność statystyczną wyliczeń uzyskałam za pomocą testu Mantela (Bohonak 2002) wykonując 30 000 randomizacji.

Graficzna wizualizacja zróżnicowania między populacjami

Analiza składowych głównych

Do wizualizacji potencjalnego grupowania populacji wykorzystałam analizę składowych głównych (ang. *Principal Component Analysis*, PCA). Analiza PCA związana jest z matematyczną procedurą, która umożliwia prostopadłe (ortogonalne) przekształcenie p -wymiarowego układu zmiennych skorelowanych na nowy układ zmiennych nieskorelowanych, tzw. składowych głównych o wymiarze mniejszym od p . Redukcja wymiaru przestrzeni cech jest przydatna ze względu na możliwość interpretacji relacji między składowymi głównymi, graficznej ilustracji konfiguracji porównywanych zmiennych oraz uporządkowania tych zmiennych według przyjętych cech. W trakcie kolejnych etapów omawianej procedury dochodzi do zmniejszenia udziału wariancji kolejnych składowych głównych w całkowitej zmienności obserwacji wielowymiarowych. Pierwsza składowa główna (PC1) ma największą wariancję, co powoduje, że największy procent całkowitej wariancji cech opisujących dane zjawisko wielowymiarowe jest wyjaśniony właśnie przez składową główną PC1. Kolejne składowe główne, tj. PC2 i PC3, tłumaczą coraz mniejszy procent pozostałej, całkowitej zmienności.

Do wykonania analiz PCA wykorzystałam program GenAlEx v.6 (Genetic Analysis in Excel; Peakall i Smouse 2006), działający jako dodatek w ramach programu Microsoft Excel (Microsoft® Office Excel® 2007, MSO 12.04518.1014). Jako dane wejściowe wykorzystałam macierze wartości zróżnicowania genetycznego wyznaczone między parami 14 populacji łośi. Analizę PCA wykonałam posługując się następującymi zbiorami

danych: matryca Φ_{ST} i F_{ST} dla mtDNA-cr, matryca R_{ST} i F_{ST} dla mikrosatelitarnego DNA oraz matryca F_{ST} dla *MHC II DRB*.

Analiza wariacji molekularnej (AMOVA)

Analiza AMOVA stanowi rodzaj hierarchicznej analizy statystyk Wright'a, która pozwala zdefiniować grupowanie populacji i określić, jaki procent zmienności genetycznej wyjaśniany jest na poszczególnych poziomach hierarchii. Zróżnicowanie wyliczane jest pomiędzy wyznaczonymi grupami (Φ_{CT}), pomiędzy populacjami w poszczególnych grupach (Φ_{SC}) oraz w obrębie populacji (Φ_{ST}).

Bazując na sekwencjach mtDNA-cr w oparciu o analizę AMOVA w programie Arlequin v.3.11 dokonałam oceny zmienności i struktury genetycznej między 14 badanymi populacjami łośi, traktując najpierw wszystkie populacje jako jedną grupę. Istotność statystyczną testowałam wykonując 10 000 permutacji. Do określenia przestrzennego wzoru genetycznej dywergencji wykorzystałam przestrzenną analizę wariacji molekularnej w programie SAMOVA ver. 1.0 (ang. *Spatial Analysis of Molecular Variance*; Dupanloup i wsp. 2002). SAMOVA pozwala dokonać identyfikacji wyraźnie różnych genetycznie populacji w porównaniu do ich geograficznej lokalizacji. Wytypowanie najbardziej prawdopodobnego, geograficznego modelu grupowania populacji przeprowadziłam wyznaczając ilość grup od $K = 2$ do $K = 8$, istotność statystyczną wyznaczając przy 10 000 permutacji.

Identyfikacja odrębnych grup genetycznych za pomocą programu Structure

Często trudno jest określić, ile odrębnych genetycznie grup występuje na analizowanym obszarze, ponieważ wyznaczenie rzeczywistej liczby populacji nie jest zadaniem łatwym. W celu zidentyfikowania grup genetycznie zróżnicowanych populacji dla 14 populacji łośi posłużyłam się programem Structure v.2.3.3 (Pritchard i wsp. 2000, 2010). Program zakłada występowanie założonych *a priori* liczb (K) różnych genetycznie grup i oparty jest o metodę grupowania przy użyciu genotypów osobników w wielu loci mikrosatelitarnych. Algorytm szacuje częstości alleli w wielu loci charakterystyczne dla każdej z K wyznaczonych grup i jednocześnie oblicza dla każdego osobnika, jaki procent jego genomu należy do każdej z K grup. Następnie sprawdzane są różne wartości K

i dokonywana jest ocena statystycznego dopasowania modelu do posiadanych danych. Istnieją dwa podejścia, które wyznaczają najbardziej prawdopodobną wartość K . W pierwszym z nich brana jest pod uwagę wartość logarytmu $\ln(K)$, który przy najbardziej prawdopodobnej liczbie grup wykazuje dużą wariancję pomiędzy seriami i który cechuje się tendencją do ciągłego, nieznacznego wzrostu, względnie utrzymuje się na jednym poziomie (Rosenberg i wsp. 2001). Drugie podejście oparte jest na zobrazowanej graficznie wartości delta K (ΔK), pokazującej wyraźny szczyt przy prawidłowej liczbie grup (Evanno i wsp. 2005).

Dla wszystkich osobników zgenotypowanych w 11 loci mikrosatelitarnego DNA przeprowadziłam łącznie cztery symulacje przypisania osobników do grup genetycznych, na początku zakładając, że analizowana pula osobników stanowi jedną grupę ($K = 1$), a następnie, że obecne są grupy od $K = 2$ do $K = 4$. W symulacjach wyznaczyłam wstępne 200 000 interakcji, by następnie wykonać 1 000 000 powtórzeń zgodnie z algorytmem MCMC (*ang.* Markov Chain Monte Carlo).

Pokrewieństwo genetyczne

Do genetycznego określenia stopnia pokrewieństwa osobników wykorzystywana jest łączna informacja uzyskana na podstawie analizy wielu polimorficznych loci autosomalnych. Wnioskowanie o pokrewieństwie wymaga zazwyczaj jego ilościowej miary określanej jako współczynnik r , którego interpretacja pozwala ocenić, jakie jest prawdopodobieństwo, że allele obecne u danego osobnika są także w posiadaniu określonego krewnego. Współczynnik r przyjmuje wartości od 0 do 1:

$r = 0$ dla osobników niespokrewnionych,

$r = 0,125$ dla kuzynów,

$r = 0,25$ dla przyrodniego rodzeństwa lub danego osobnika i jego wujków, ciotek, dziadków oraz wnuków,

$r = 0,5$ dla pełnego rodzeństwa i par rodzic-potomek,

$r = 1$ dla bliźniąt jednojajowych.

Korzystając z programów Kinship (Goodnight i Queller 1999) i Kingroup v.2 (Konovalov i wsp. 2004) opartych na statystycznej metodzie największej wiarygodności wyliczyłam współczynnik pokrewieństwa genetycznego (r) dla wszystkich par osobników w każdej

analizowanej populacji i dla wszystkich populacji potraktowanych jako jedna grupa oraz średnią wartość r dla każdej populacji i dla całej próby, wykonując 10 000 permutacji. Następnie w programie FSTAT v.2.9.3 (Goudet 1995) testowałam istotność różnic tego parametru między poszczególnymi populacjami, wykonując 10 000 permutacji.

Przepływ genów między populacjami i identyfikacja migrantów

Przepływ genów zazwyczaj wyraża się jako tempo migracji m , czyli proporcja alleli w populacji pochodzących od osobników będących imigrantami w danym pokoleniu. Bezwzględna liczba osobników wymieniana między populacjami w ciągu każdego pokolenia określana jest jako Nm . Średnią liczbę migrantów (Nm) wyliczyłam ze wzoru (Wright 1978):

$$Nm = (1 - F_{ST})/4F_{ST},$$

wykonując obliczenia dla mtDNA-cr i 11 loci mikrosatelitarnych, a następnie porównując uzyskane wartości Nm wyliczone dla mikrosatelitarnego DNA i dla mtDNA-cr. Wraz ze wzrostem liczby migrantów spada wartość F_{ST} , czyli spada zróżnicowanie między populacjami. Gdy populacje charakteryzuje swobodny przepływ genów ($Nm \gg 10$), brak jest między nimi zróżnicowania genetycznego. W skrajnym przypadku, gdy mamy izolowane populacje, które w ogóle nie wymieniają między sobą genów, $Nm = 0$, a $F_{ST} = 1$. W przypadku mtDNA, dziedziczonych tylko w linii matczynej, całkowita liczba migrantów wymienianych między dwiema populacjami na pokolenie (M) wynosi $2Nm$, natomiast w przypadku mikrosatelitarnego DNA – $4Nm$ (Hamilton i wsp. 2005). Płeć wykazująca większą skłonność do dyspersji charakteryzuje się niższymi międzypopulacyjnymi wartościami zróżnicowania genetycznego, niż płęć, którą cechuje mniejszy potencjał do dyspersji (Mossman i Waser 1999). Porównanie wartości Nm dla mtDNA i mikrosatelitarnego DNA pozwala wykryć, czy osobniki obu płci podejmują dyspersję w jednakowym stopniu.

Genotypy osobników zidentyfikowane w mikrosatelitarnym DNA posłużyły mi również do wyznaczenia w programie GeneClass2 (Piry i wsp. 2004) osobników, które

stanowiły pierwsze pokolenie imigrantów (F_0) i do zidentyfikowania ich prawdopodobnych populacji źródłowych. Prawdopodobieństwo wykrycia migrantów w pierwszym pokoleniu wyliczane jest ze wzoru (Paetkau i wsp. 2004):

$$L = L_{home}/L_{max},$$

gdzie: L_{home} oznacza prawdopodobieństwo wyliczone dla populacji, z której osobnik był pobrany,

L_{max} – wartość największego prawdopodobieństwa pomiędzy wszystkimi populacjami, w tym też populacji, z której osobnik został pobrany.

Program GeneClass2 przyporządkowuje poszczególne osobniki według metod *bayesowskich* (Rannala i wsp. 1997), które oparte są na normalnym rozkładzie frekwencji alleli w populacji oraz metod genetycznych dystansów, przyporządkowujących osobniki do populacji kierując się ich najmniejszym dystansem genetycznym. W analizach zastosowałam metodę Paetkau i wsp. (1995) opartą na frekwencji alleli, przyjmując wartość 0,01 jako frekwencję dla brakujących alleli. Prawdopodobieństwo wykluczenia osobnika, w przypadku, gdy potencjalnie źródłowa populacja okazuje się nią nie być, liczyłam zgodnie z algorytmem Monte Carlo wykonując 1 000 symulacji (Paetkau i wsp. 2004) i zakładając dla wartości *alfa* wartość progową 0,01.

Identyfikacja sygnału doboru naturalnego

Testowanie działania doboru jest jednym z najważniejszych elementów analiz, w których wykorzystane są złożone genotypy osobników w wielu loci. Jednym z narzędzi, umożliwiającym identyfikację loci znajdujących się pod wpływem działania doboru naturalnego, jest program LOSITAN (ang. *LOoking for Selection In a TANGled dataset*; Antao i wsp. 2008). Program LOSITAN pozwala wykryć loci wykazujące wartości zróżnicowania genetycznego odbiegające od pozostałych (ang. „*outlier*”) w oparciu o metodę FDist (Beaumont i Nichols 1996), wykorzystywaną dla markerów molekularnych kodominujących, takich jak mikrosatelitarny DNA, SNPs czy allozymy. Pozwala ona wyznaczyć związek pomiędzy współczynnikiem Wright’a F_{ST}

i heterozygotycznością oczekiwaną (H_E) poprzez porównanie obserwowanego rozkładu F_{ST} vs H_E i rozkładu oczekiwanego w modelu wyspowym migracji z markerami neutralnymi. Loci, które mają zdecydowanie wyższe lub niższe niż oczekiwane wartości F_{ST} są rozpoznawane jako „outliersi”, czyli kandydaci podlegający działaniu doboru. W programie LOSITAN, najpierw w oparciu o wszystkie loci, wyznaczana jest wartość średnia F_{ST} . Następnie, po pierwszej serii analiz, loci znajdujące się poza granicami przyjętego przedziału ufności są usuwane, a wartość średnia F_{ST} jest liczona ponownie dla domniemanych loci neutralnych, które nie zostały usunięte. W trakcie wyliczeń usuwane są najbardziej odbiegające loci, przy czym wszystkie loci są uwzględnione w obliczeniach ostatniej serii analiz, dzięki czemu zostaje oszacowany ich status, określający, czy i jakiemu rodzajowi doboru podlegają.

Program LOSITAN wykorzystałam do sprawdzenia, czy locus *MHC II DRB* jest kandydatem na „outliera”, który podlega działaniu doboru naturalnego. Jako tło genetyczne wykorzystałam 11 loci mikrosatelitarnego DNA, na które z zasady nie działa dobór. Zastosowałam w każdej serii 10 000 symulacji, co pozwoliło mi zidentyfikować górne i dolne limity wartości F_{ST} przy 95% poziomie ufności (95% C.I.).

Analizy filogenetyczne mitochondrialnego DNA

Wybór modelu substytucji nukleotydowej

Podstawowym zadaniem metod rekonstrukcji drzew jest wybór takiego drzewa, które będzie najbardziej stabilne i wiarygodne, przy określonych założeniach metody i wybranym modelu (Hall 2008). Istotnym elementem jest więc wyznaczenie najbardziej odpowiedniego modelu, który pozwoli oszacować relacje filogenetyczne na podstawie sekwencji DNA zobrazowane odpowiednim drzewem filogenetycznym.

Istnieje wiele modeli substytucji, opartych na różnych parametrach, służących wyznaczaniu dystansu między sekwencjami. Do parametrów modelu ewolucji sekwencji nukleotydowych zaliczamy częstości nukleotydów, prawdopodobieństwo zmiany nukleotydu w każdy inny, nierówne tempom mutacji dla różnych pozycji w sekwencji oraz proporcję pozycji niepodlegających zmianom w sekwencji. Najprostszym modelem jest jednoparametryczny model Jukes-Cantora (1969, *JC69*), który zakłada, że częstość występowania wszystkich czterech nukleotydów w sekwencji jest jednakowa i wynosi

25%. Autorzy modelu (1969) przyjęli, że każdy nukleotyd w każdej pozycji sekwencji zmienia się w jeden z trzech pozostałych nukleotydów z równym prawdopodobieństwem. Model nie uwzględnia faktu, że tranzycje (T_z) zachodzą częściej niż transwersje (T_v), co może znacznie wpływać na wynik analiz. Warunek zakładający różne tempo zajścia mutacji typu tranzycji i transwersji uwzględnia z kolei dwuparametryczny model Kimury (1980, *K2P*, *K80*). Współczynnik T_z do T_v dla większość genów jądrowych zawiera się w przedziale 0,5 – 2,0, a w przypadku mtDNA może dochodzić nawet do 15. Wynika to z prostej przyczyny, według której tranzycje nukleotydowe są bardziej prawdopodobne, ponieważ zamiana zachodzi między związkami o podobnej budowie, natomiast transwersje dotyczą związków o odmiennej strukturze. Większość tranzycji ma także charakter milczący, podczas gdy transwersje częściej powodują zmianę aminokwasu. Trójparametryczne modele, np. Felsensteina (1984, *F84*), Hasegawy-Kishino-Yano (1985, *HKY85*) i Tamura-Nei (1993, *TN93*) uwzględniają różnice w częstości występowania poszczególnych nukleotydów w badanych sekwencjach oraz proporcje T_z do T_v . Najbardziej złożonym modelem jest tak zwany model ogólny, który dla każdego z 12 możliwych podstawień zakłada parametr określający prawdopodobieństwo tego podstawienia. Jego nieco uproszczoną wersją jest model substytucji nukleotydów zakładający odwracalność ewolucji (ang. *General Time Reversible*, *GTR*; Tavaré 1986). W modelu tym prawdopodobieństwo zmiany jednego nukleotydu w inny (np. $A \rightarrow C$) jest takie same, jak zmiany powrotnej (czyli np. $C \rightarrow A$). Model uwzględnia sześć parametrów opisujących częstość poszczególnych typów mutacji i cztery parametry opisujące częstość nukleotydów. Z założenia, bardziej złożone modele, oparte na większej liczbie parametrów, mogą lepiej oszacować odległość między sekwencjami, ale jeśli uwzględnimy, że wariancja (d) wzrasta proporcjonalnie do liczby parametrów, to zastosowanie prostszego modelu może w niektórych przypadkach dać taki sam rezultat, jak wykorzystanie skomplikowanego modelu wymagającego dużych nakładów mocy obliczeniowej (Nei i Kumar 2000).

Metody, które wykorzystywane są do wyboru modelu ewolucji, opierają się na porównaniu wiarygodności (ang. *likelihood*) wyznaczonych modeli i statystycznym przetestowaniu, czy uzasadnione jest wprowadzanie do modelu większej liczby parametrów, które dany model czynią bardziej skomplikowanym. Wśród najpopularniejszych wymieniany jest test *LRT* (ang. *likelihood ratio test*), porównujący

wiarygodność modeli zagnieżdżonych, test oparty o kryterium informacji Akaike (ang. *Akaike Information Criterion, AIC*) oraz test oparty na bayesowskim kryterium informacji (ang. *Bayesian Information Criterion, BIC*). Dwa ostatnie testy wykorzystywane są do porównywania modeli niezagnieżdżonych i uwzględniają zarówno kary, będące efektem wprowadzenia dodatkowych parametrów oraz nagrody za lepsze dopasowanie do danych.

Zbiór możliwych modeli dla sekwencji analizowanych genów mtDNA wyznaczyłam korzystając z programu jModelTest (Posada 2008) za pomocą testu *AIC*, w którym kryteria informacji wyliczane są ze wzoru:

$$AIC = -2 \ln L + 2k,$$

gdzie: L to wiarygodność badanego modelu,

k jest liczbą parametrów modelu,

n oznacza liczbę pozycji nukleotydowych.

Przygotowanie danych do konstrukcji drzew filogenetycznych

Wśród możliwych do otrzymania drzew są drzewa nieukorzenione i ukorzenione. Warunkiem wygenerowania drzewa ukorzenionego jest uwzględnienie w analizach grupy zewnętrznej (ang. *outgroup*). Grupę zewnętrzną stanowią sekwencje, które są dalej spokrewnione z sekwencjami grupy wewnętrznej, niż sekwencje tej grupy ze sobą nawzajem. Drzewa ukorzenione zawierają wyszczególniony węzeł, zwany korzeniem, reprezentujący ostatniego wspólnego przodka analizowanych jednostek taksonomicznych (ang. *operational taxonomic units, OTU*), których sekwencje wykorzystane zostały do konstrukcji drzewa.

Jako grupę zewnętrzną przy konstrukcji drzew filogenetycznych opartych o haplotypy mtDNA wyznaczyłam sekwencje mtDNA dwóch gatunków z rodziny jeleniowatych, mianowicie renifera (GenBank nr sekwencji AB245426, Wada i wsp. 2005, dane niepubl.) i jelonka błotnego (*Hydropotes inermis*, GenBank nr NC011821, Liu i Huang 2009, dane niepubl.). Oprócz haplotypów, które stwierdziłam w trakcie badań, do wygenerowania poszczególnych drzew wykorzystałam także sekwencje mtDNA łośi dostępne w GenBanku (NCBI). Dla drzewa obrazującego pokrewieństwa filogenetyczne pomiędzy haplotypami mtDNA-cr były to sekwencje *A. alces* opisane przez Hundertmarka

i wsp. (2002a) o następujących numerach: AF412225, AF412226, AF412227 – AF412234, AF412253, AF412254, AF412257 – AF412260, AF412262 – AF412264 i AF412266. Natomiast dla zobrazowania relacji filogenetycznych w obrębie cytochromu *b* mtDNA skorzystałam z sekwencji opracowanych przez Ludta i wsp. (2001, dane niepubl.) dla *A. a. cameloides* (GenBank nr AY035872) i *A. a. pfizenmayeri* (GenBank nr AY035873) oraz przez Naidu i wsp. (2012) dla *A. alces* (GenBank nr JF489131). Do odtworzenia relacji filogenetycznych sekwencji mtDNA-cr połączonych z cytochromem *b* mtDNA to wykorzystałam warianty genetyczne dla *A. alces* (GenBank nr JN632595, Hassanin i wsp. 2012) i *R. tarandus* (Wada i wsp., dane niepubl.).

Konstrukcja drzew filogenetycznych za pomocą metody dystansów: łączenia sąsiadów (NJ), metody maksymalnego prawdopodobieństwa (ML) oraz metody wnioskowania bayesowskiego

Do konstrukcji drzew filogenetycznych przedstawionych w niniejszej rozprawie użyłam trzech metod: *NJ* (ang. *Neighbor-Joining*), *ML* (ang. *Maximum Likelihood*) oraz metody wnioskowania *bayesowskiego* (ang. *bayesian inference*, *BI*).

Metody dystansów uważane są za jedne z najprostszych i najszybszych metod wykorzystywanych w analizach filogenetycznych. Ich główną istotą jest obliczenie dla każdej pary sekwencji parametru, który wyznaczałby miarę ich niepodobieństwa, czyli odległości, najczęściej rozumianej jako liczba mutacji pomiędzy obiema sekwencjami. W efekcie dokonuje się konwersji sekwencji na macierz dystansów par wszystkich kodowanych sekwencji. Z szeregu licznych algorytmów przeznaczonych do budowy drzewa na podstawie macierzy dystansów, najczęściej stosowaną jest metoda łączenia sąsiadów, *NJ* (Saitou i Nei 1987). Metoda *NJ* opiera się na łączeniu sekwencji w pary, tak by w powstałym drzewie długość gałęzi była jak najmniejsza. Algorytm wykorzystany do budowy drzewa *NJ* nie zakłada stałego tempa substytucji na różnych gałęziach danego drzewa. Jako punkt wyjścia wykorzystywane jest drzewo o topologii gwiazdy, w którym wszystkie węzły połączone są jednym węzłem centralnym. W pierwszej rundzie wybierana jest taka para sekwencji, z połączenia której w następnym etapie otrzymujemy drzewo o najkrótszej całkowitej długości gałęzi. Procedura ta jest powtarzana do momentu wyłonienia wszystkich „sąsiadów” i zbudowania drzewa. Na podstawie wygenerowanej

serii macierzy otrzymujemy drzewo ściśle dychotomiczne, bowiem z każdego wewnętrznego węzła wychodzą dokładnie dwie gałęzie. Metoda *NJ* bazuje również na założeniu addytywności, ponieważ odległość między dwoma dowolnymi węzłami na drzewie odpowiada sumie długości wszystkich łączących je gałęzi.

Do rekonstrukcji drzewa metodą *NJ* użyłam programu Mega v.5.05 (Tamura i wsp. 2011). Ocenę istotności statystycznej uzyskanego drzewa przeprowadziłam za pomocą testu samopróbkowania (ang. *bootstrap*; Felsenstein 1985), który symuluje powtarzanie zbieranych danych w celu oszacowania rzetelności drzewa. Całą procedurę, związaną między innymi z konstruowaniem drzewa i rejestracją węzłów obecnych w wyjściowym drzewie, powtarzałam 1 000 razy. Liczba zbieżnych i różnych gałęzi była notowana i wyrażana w procentach, przypisywanych danemu węzłowi, jako procent poparcia *bootstrap* (ang. *bootstrap support*, *BS*). Niskie wartości *BS* nie oznaczają fałszywych powiązań, lecz wskazują, że są one słabo potwierdzone, np. przez niewielką liczbę danych, jakimi dysponujemy. Wartości *BS* > 70% pozwalają z kolei wnioskować, że wykorzystane dane były bogate w informacje, a otrzymanemu węzłowi możemy przypisać rozsądne, tj. duże prawdopodobieństwo.

Metoda maksymalnego prawdopodobieństwa, *ML* (Cavalli-Sforza i Edwards 1967; Felsenstein 1981) należy do grupy metod przeszukujących przestrzeń drzew filogenetycznych i badających niepewność w oparciu o funkcję wiarygodności. *ML* uważana za jedną z najdokładniejszych metod, w której dla danego zbioru sekwencji przy założonym modelu substytucji wartości wiarygodności są obliczane dla każdej możliwej topologii.

Do rekonstrukcji drzew metodą *ML* użyłam programu Mega v.5.05 (Tamura i wsp. 2011). Stopień poparcia dla poszczególnych zgrupowań sekwencji wyróżnionych w analizie filogenetycznej określiłam stosując 1 000 powtórzeń *bootstrap*. Wariant topologii drzewa kreowałam zgodnie z algorytmem zmian najbliższego sąsiada (ang. *Nearest Neighbor Interchange*, *NNI*), który wyszukuje topologię najlepiej pasującą do zbioru danych. Dla wygenerowanego wariantu drzewa wyliczane są optymalne długości poszczególnych gałęzi, a najbardziej prawdopodobne z nich zapamiętywane są jako najlepszy wybór. Następnie powtarzane jest losowanie z oryginalnego zbioru danych, zbiorów o tej samej wielkości. Dla każdego miejsca na drzewie wyznaczane jest jego

prawdopodobieństwo w postaci logarytmu wiarygodności ($\ln L_i$). Logarytm wiarygodności całego drzewa stanowi suma logarytmów wiarygodności wszystkich jego miejsc:

$$\ln L_{\text{drzewo}} = \sum_{i=1}^n \ln L_i,$$

gdzie: $\ln L_{\text{drzewo}}$ jest logarytmem wiarygodności zaobserwowania przyrównania w warunkach określonego modelu ewolucyjnego i drzewa o określonej topologii i długości gałęzi.

Metody *ML* starają się więc znaleźć drzewo o największym logarytmie wiarygodności.

Analiza *bayesowska* (Rannala i Yang 1996; Mau i Newton 1997) jest odmianą metody największej wiarygodności, poszukującej nie jedyne właściwego drzewa filogenetycznego, ale całego ich zbioru o zbliżonych wartościach prawdopodobieństwa wobec istniejących danych i zastosowanego modelu ewolucji sekwencji. Analiza ta najczęściej odwołuje się do metody Monte Carlo z wykorzystaniem łańcucha Markowa (ang. *Markov Chain Monte Carlo method, MCMC*, Yang i Rannala 1997; Larget i Simon 1999; Mau i wsp. 1999), w której wykorzystuje się algorytm Metropolisa-Hastingsa (*MH*; Metropolis i wsp. 1953; Hastings 1970; Green 1995), pobierając próby drzew z rozkładu prawdopodobieństwa *a posteriori*. Istotą metody *MCMC* jest losowe przemieszczanie się po przestrzeni drzew, w czasie której zmianie mogą ulegać wartości parametrów modelu, takie jak między innymi topologia i długość gałęzi. Łańcuch inicjalizowany jest od losowo wybranego drzewa, a następnie proponowane jest nowe drzewo i obliczany jest stosunek wiarygodności nowego drzewa do starego poprzez losowanie liczby z przedziału od 0 do 1. Jeżeli jest ona mniejsza od obliczonego stosunku prawdopodobieństw, to zostaje przyjęte nowe drzewo, w przeciwnym razie aktualny stan pozostaje nadal. W ten sposób generowane jest jedno pokolenie łańcucha. Mimo ogólnej tendencji akceptowania drzew o stopniowo wzrastającej wiarygodności, warto zaznaczyć, że przyjmowane są również drzewa o niższej wiarygodności, gdy wartości te są nieco mniejsze od aktualnego drzewa. Proces proponowania nowych stanów, kalkulowania prawdopodobieństwa akceptacji oraz akceptowania lub odrzucania nowych stanów jest powtarzany przez miliony pokoleń, przez co, zapisując stany co kilkaset pokoleń, formuje się łańcuch Markowa (Huelsenbeck

i wsp. 2001). Interpretacja wyników symulacji jest prosta: prawdopodobieństwo *a posteriori* danego drzewa jest proporcjonalne do liczby jego wystąpień w próbie drzew zapisanych w czasie symulacji *MCMC*, natomiast prawdopodobieństwo *a posteriori* wyznaczonych kładów jest sumą prawdopodobieństw drzew na których dany kład został stwierdzony.

Do oszacowania drzew metodą *bayesowską* wykorzystałam program Beast v.1.6.2 (ang. *Bayesian evolutionary analysis sampling trees*; Drummond i wsp. 2012). Analizy prowadziłam zgodnie z algorytmem *MCMC* stosując 30 000 000 interakcji i traktując pierwsze 10% interakcji, jako wstępne oraz dokonując zapisu co 3 000 pokoleń. Uzyskane drzewa odczytałam w programie TreeAnnotator v1.7.2 wchodzącym w skład programu Beast, a następnie odtworzyłam graficznie w programie FigTree v1.3.1 (Rambaut 2009).

Sieci haplotypów

Ocena relacji występujących między haplotypami z wykorzystaniem tradycyjnych metod przeznaczonych do rekonstrukcji filogenetycznych, takich jak metoda maksymalnej parsymonii czy też metoda łączenia sąsiadów, często obarczona jest licznymi trudnościami. Obok zastosowania tradycyjnych metod, rezultat otrzymania wielu możliwych drzew jest najlepiej wyrażony poprzez sieć filogenetyczną, która obrazuje alternatywne, potencjalne powiązania między sekwencjami nukleotydowymi. W sieciach filogenetycznych można określić istniejące współcześnie sekwencje, sekwencje nieznaleszone przez nas w badanym materiale, czy też sekwencje osobników wymarłych oraz przedstawić związki z sekwencjami, które od nich pochodzą. Sieci filogenetyczne umożliwiają również uzyskanie znacznie większej ilości informacji filogenetycznej, zawartej w analizowanych sekwencjach (Posada i Krandall 2001). Przykładem mogą tu być pętle, uzyskiwane podczas konstrukcji sieci filogenetycznych. Z jednej strony są one produktem homoplazji, a z drugiej strony mogą wskazywać na zjawisko rekombinacji. Większość metod wykorzystywanych do tworzenia sieci należy do metod dystansów, które opierają się na wspólnej idei minimalizowania dystansów, rozumianych jako liczba mutacji występujących wśród analizowanych haplotypów. Jedną z popularnych technik konstruowania sieci filogenetycznych są algorytmy *MJ* (ang. *median joining*) programu Network, łączące cechy algorytmu Kruskal'a szukającego drzew *MS* (ang. *minimum-spanning*) poprzez faworyzowanie krótkich połączeń oraz heurystycznego algorytmu *MP*

Farris'a, który kolejno dodaje nowe rozgałęzienia (ang. *median vectors*). W metodzie tej, na początku łączone są drzewa *MS* wewnątrz pojedynczej sieci. Drzewa *MS* konstruowane są poprzez łączenie n liczby haplotypów, przez co w konsekwencji powstaje kompletna sieć zawierająca $n-1$ gałęzi. Drzewo jest minimalne wtedy, kiedy całkowita długość gałęzi jest minimalną długością niezbędną do połączenia wszystkich n haplotypów. Następnie, zgodnie z kryterium parsymonii, do konstruowanej sieci dodawane są brakujące haplotypy, nazywane *median vectors*. Metoda *MJ* jest wyjątkowo szybką metodą, która analizuje tysiące haplotypów w rozsądnym czasie, ale warunkiem koniecznym do jej zastosowania jest brak rekombinacji.

W programie Network 4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) skonstruowałam sieć dla połączonych sekwencji mtDNA (sekwencje mtDNA-cr i cytochromu *b* mtDNA) oraz sieć dla sekwencji genu *DBY14* znalezionych u łosi, przy sporządzaniu której wykorzystałam również jedną sekwencję genu *DBY14* uzyskaną dla sarny europejskiej (Świsłocka, dane niepubl.) oraz sekwencje uzyskane z GenBanku dla bawołu domowego, *Bubalus bubalis* (GenBank nr AY936552), bizona (GenBank nr AY936553), gaura, *Bos gaurus* (GenBank nr AY936554) i bydła domowego (GenBank nr AY936555).

Datowanie zdarzeń ewolucyjnych

Zuckerlandl i Pauling (1962) w oparciu o założenie, że tempo ewolucji mierzone liczbą podstawień nukleotydowych lub zmian w sekwencji aminokwasowej jest względnie stałe w czasie we wszystkich liniach rodowych, jako pierwsi stwierdzili, że sekwencje DNA i białka są dobrym miernikiem czasu do datowania wydarzeń ewolucyjnych. Koncepcja ta, nazywana koncepcją zegara molekularnego, głoszona i broniona później przez Wilsona (Wilson i wsp. 1977, 1987), stanowi jedną z najbardziej spektakularnych i zaskakujących konsekwencji filogenetyki molekularnej. Jej idea wynika z teorii neutralnej ewolucji Kimury (1983), według której:

$$k = 2Nl'u,$$

gdzie: k – tempo utrwalania substytucji na pozycję nukleotydową na rok,

- $2N$ – rozmiar diploidalnej populacji,
- l – liczba pojawiających się substytucji na rok,
- u – prawdopodobieństwo utrwalenia się substytucji.

W przypadku, gdy ewolucja danej molekuly jest neutralna to $u = l/2N$, a więc prawdopodobieństwo utrwalenia się mutacji jest tym większe, im dana populacja jest mniejsza. W efekcie otrzymujemy jedną z najważniejszych formuł ewolucji molekularnej, według której tempo utrwalania neutralnych substytucji zależy tylko i wyłącznie od ich tempa pojawiania się, a zatem w tym samym genie i w różnych liniach ewolucyjnych liczba powstających mutacji jest w przybliżeniu taka sama.

W programie Mega v.5.05 (Tamura i wsp. 2011) wyliczyłam dywergencję sekwencji netto (Da) dla mtDNA-cr (607 pz) pomiędzy europejskimi kładami łośi oraz pomiędzy poszczególnymi gałęziami/grupami kładu Centralna Europa zdefiniowanymi na drzewie filogenetycznym, korzystając ze wzoru (Nei i Li 1979):

$$Da = D_{XY} - (d_X + d_Y)/2,$$

gdzie: d_{XY} – średni dystans pomiędzy grupami X i Y analizowanego taksonu,

d_X i d_Y – średni dystans wewnątrz grup.

Analizę przeprowadziłam zgodnie z założeniami modelu Tajima-Nei, a istotność statystyczną testowałam metodą *bootstrapu* wykonując 1 000 replikacji. Obliczenia wartości Da wykonałam również w programie DnaSP v.5 według modelu Jukes i Cantora (1969), zgodnie z którym oceniłam odchylenie standardowe. Następnie, przyjmując tempo ewolucji regionu kontrolnego oszacowane dla Cervidae rzędu 4 – 8% na 1 mln lat i 2% na 1 mln lat dla cytochromu *b* (Randi i wsp. 1998), określiłam przybliżony czas rozdzielenia się poszczególnych kładów/grup filogenetycznych łośi. Analizy te wykonałam również przy założeniu tempa mutacji dla regionu kontrolnego mtDNA rzędu 31,4% substytucji na 1 milion lat przewidziane dla bydła domowego (Bradley i wsp. 1996).

Rozkład liczby niedopasowań nukleotydowych (ang. mismatch distribution)

Rozkład liczby niedopasowań nukleotydowych (Rogers i Harpending 1992) pomiędzy wszystkimi haplotypami dostarcza informacji na temat historii zmian

demograficznych, które zaszły w populacji. Rozkład ten zwykle przyjmuje obraz multimodalny w przypadku prób, pochodzących z populacji znajdującej się w demograficznej równowadze. Jest on z kolei jednomodalny, gdy populacja przeszła przez etap niedawnej ekspansji demograficznej, zachodzącej na przykład po efekcie wąskiego gardła (Rogers i Harpending 1992) lub w wyniku wysokiego poziomu migracji zachodzącej pomiędzy sąsiadującymi populacjami (Ray i wsp. 2003; Excoffier 2004). Bazując na sekwencjach mtDNA-cr (607 pz) wykonałam wykresy przedstawiające rozkład liczby niedopasowań dla 13 populacji łośi występujących w Polsce potraktowanych jako jedna grupa, dla kładu Centralna Europa, grupy Biebrza oraz Fennoscandia. Dodatkowo, sporządziłam wykres rozkładu liczby niedopasowań nukleotydowych dla grupy Biebrza w oparciu o sekwencje odcinka mtDNA-cr o długości 351 par zasad. W przypadku, gdy otrzymany wykres rozkładu niedopasowań nukleotydowych przyjmuje gładki kształt i jest jednomodalny możemy wyliczyć czas ekspansji (Mao i wsp. 2010). Parametry opisujące ekspansje to: Tau (τ), Theta0 (θ_0) i Theta1 (θ_1), SSD (wartość testu najmniejszych kwadratów) oraz indeks *raggedness*.

Parametr τ (Tau) oznacza czas ekspansji od wielkości populacji N_0 do N_1 liczony w jednostkach mutacyjnych i obliczany jest ze wzoru (Rogers 1995):

$$\tau = 2\mu t,$$

gdzie: τ – czas ekspansji w jednostkach mutacyjnych,
 t – czas ekspansji demograficznej;

$$\mu = \lambda g,$$

gdzie: λ – tempo mutacji/1mln lat i x długość sekwencji,
 g – długość pokolenia danego gatunku.

Parametr τ może czasem prowadzić do niedoszacowania wieku ekspansji, dlatego stosuje się θ_0 i θ_1 , które są iloczynem wielkości populacji N_0 i N_1 oraz tempa mutacji.

Indeks *raggedness* (r ; Harpending 1994) jest wskaźnikiem nierówności obserwowanego rozkładu liczby niedopasowań nukleotydowych i obliczany jest ze wzoru:

$$r = \sum_{i=1}^{d+1} (x_i - x_{i-1})^2,$$

gdzie: x_i – frekwencja haplotypów, które różnią się w i pozycji,

d – maksymalna liczba obserwowanych różnic.

Wskaźnik r przyjmuje niskie wartości dla rozkładów jednomodalnych, z płynną ekspansją demograficzną, a wysokie dla rozkładów multimodalnych, w populacjach stacjonarnych (Rogers i Harpending 1992).

Analizy przeprowadziłam w programie Arlequin v.3.11 i DnaSP v.5, testując istotność indeksu r metodą *bootstrap*, wykonując 1 000 replikacji i wyliczając istotność statystyczną wskaźnika *SSD* przy porównaniu obserwowanego i oczekiwanego rozkładu liczby niedopasowań nukleotydowych.

WYNIKI

Mitochondrialny DNA – zmienność, dywergencja, struktura

Sekwencje regionu kontrolnego mtDNA w populacjach współczesnych

Sekwencje tRNA^{pro} o długości 55 par zasad połączone z odcinkiem regionu kontrolnego mtDNA o długości 552 par zasad (łącznie długość analizowanego odcinka – 607 pz) otrzymałam dla 588 osobników z Polski, 15 osobników z Litwy i 9 z Niemiec. W analizowanym materiale stwierdziłam występowanie 12 haplotypów, w tym siedmiu do tej pory nieopisanych u łośi. Zidentyfikowane 12 wariantów genetycznych stanowi 71% ogółu haplotypów mtDNA-cr łośi opisanych w Europie. Wprowadzone w niniejszej rozprawie kolejne numery od H1 do H12 nadane poszczególnym haplotypom są efektem przeprowadzonej w 2010 roku jednolitej standaryzacji sposobu oznaczania wariantów genetycznych łośi wykrytych przez Zakład Zoologii Kręgowców Instytutu Biologii UwB oraz przez dr Magdalenę Niedziałkowską i współpracowników z Instytutu Biologii Ssaków PAN w Białowieży. Natomiast pozostałym haplotypom, tj. H13, H17, H20 i H22 nadałam pierwsze, dostępne numery. Haplotyp H1 (GenBank nr EU257814), nazwany przeze mnie haplotypem „biebrzańskim”, został opisany dla łośi z doliny Biebrzy we wcześniejszych badaniach (Świsłocka i wsp. 2008). W badanej próbie 612 osobników wykryłam cztery haplotypy zidentyfikowane przez Hundertmarka i wsp. (2002a) dla łośi z Półwyspu Skandynawskiego: H2, nazwany od miejsca znalezienia Finlandia2 (GenBank nr AF412232), H3, określony jako Finlandia3 (GenBank nr AF412233), H4, występujący pod nazwą Finlandia1 (GenBank nr AF412231) i H6, znany jako Szwecja1 (GenBank nr AF412230).

Frekwencje 12 haplotypów w próbie 588 osobników z Polski zawarły się w przedziale od 0,002 (haplotypy: H6, H20 i H22) do 0,36, dla haplotypu H1, charakterystycznego dla większości łośi z doliny Biebrzy (Tabela 6; Rycina 2). Drugim, obok H1, haplotypem najczęściej stwierdzanym w Polsce był „fiński” wariant genetyczny H2, który okazał się dominującym haplotypem w próbie z Litwy, z frekwencją w tej populacji wynoszącą 0,46 i jedynym haplotypem znalezionym u łośi z Niemiec (Tabela 6;

Rycina 2). Osobniki posiadające jeden z trzech „fińskich” wariantów genetycznych (H2, H3 i H4) stanowiły 44% ogółu zbadanych łośi z Polski. Wartym zauważenia jest także fakt, że aż 94% osobników pochodzących z Litwy posiadało jeden z trzech „fińskich” wariantów mtDNA. Uwagę zwraca również znacząca w Polsce frekwencja haplotypu H11 (0,13), który jest wyraźnym śladem po udanej reintrodukcji łośi z Białorusi do Kampinoskiego Parku Narodowego. Haplotyp ten nazwany został przeze mnie „kampinoskim”.

Ze względu na zdecydowaną nadreprezentację liczby osobników z doliny Biebrzy w próbie z Polski, mogłaby pojawić się wątpliwość, na ile przedstawione przeze mnie frekwencje haplotypów odzwierciedlają ich rzeczywistą częstość występowania w próbie z całego kraju. W związku z tym, przeprowadziłam analizy na próbie 433 osobników pochodzących z 12 populacji, określające udział poszczególnych haplotypów, nie uwzględniając w obliczeniach populacji z doliny Biebrzy. Z najwyższą frekwencją, równą 0,30, stwierdziłam występowanie haplotypu fińskiego H2, natomiast haplotyp „biebrzański” H1, był z kolei drugim co do częstości haplotypem, który posiadał w zasadzie co piąty zanalizowany osobnik (Tabela 6). Jeden z trzech „fińskich” haplotypów (H2, H3 i H4), których zsumowane frekwencje wyniosły 0,5, posiadał co drugi zbadany przeze mnie łoś z Polski. Z kolei osobniki, będące potomkami łośi przywiezionych z Białorusi do Puszczy Kampinoskiej stanowiły aż 20% ogółu zanalizowanych osobników, mimo iż wywodzą się maksymalnie od 1 – 3 samic.

Różnorodność haplotypowa (h) w próbie z całej Polski, liczona dla 27 populacji, wyniosła $0,758 \pm 0,010$, natomiast różnorodność nukleotydowa (π) – $1,202$ (%) $\pm 0,623$ (Tabela 11). Stwierdzone haplotypy mtDNA-cr wyróżniały się obecnością 27 miejsc polimorficznych, spośród których wszystkie miały charakter tranzycji. Przeprowadzone analizy nie wykryły występowania transwersji, delecji czy też insercji. Średnia liczba różnic między parami porównywanych sekwencji wyniosła $7,298 \pm 3,422$ substytucji (Tabela 11).

Spośród 27 populacji z Polski do szczegółowych analiz wewnątrzpopulacyjnych i międzypopulacyjnych wybrałam 13 (numery 1 – 13; Tabela 1 i 2; Rycina 1). Były to populacje zlokalizowane na terenie zwartego zasięgu występowania łośia. Do analiz tych włączyłam również 15 osobników z Litwy, potraktowanych jako jedna populacja. W poszczególnych populacjach z Polski liczba haplotypów wahała się od 2 (pop. MSZ) do

6 (pop. MRG, SRO, GWL, KPN; Tabela 11). Spośród 12 haplotypów mtDNA-cr pięć odznaczało się najwyższymi frekwencjami w poszczególnych populacjach. Haplotyp „biebrzański” H1 był najczęściej stwierdzanym haplotypem w populacjach BIE, NPN, MSZ, MRG, KWD i LDZ (Tabela 7). Warianty „fińskie” H2 i H3 dominowały w populacjach zlokalizowanych wzdłuż wschodniej i północnej granicy Polski: PAU, PKN, PPN i SRO. Haplotyp H11 z najwyższą frekwencją wystąpił w populacjach Polski Centralnej: KPN (frekwencja 0,72) i RDZ (frekwencja 0,40; Tabela 7). Co ciekawe, pojedyncze osobniki posiadające haplotyp „kampinoski” H11 odnotowałam w populacjach zlokalizowanych na Mazurach: MRG i LDZ. Ostatnim haplotypem, który wyróżniał się bardzo wysoką frekwencją, był haplotyp H13, dominujący w populacji GWL (frekwencja 0,32). Niezwykle interesujący jest również fakt, że w populacji KPN wystąpił, co prawda z bardzo niską frekwencją (0,01), wariant genetyczny H6, opisany przez Hundertmarka i wsp. (2002a) w reliktovej populacji łośi ze Szwecji. Frekwencje 12 haplotypów mtDNA-cr w badanych populacjach łośi przedstawiłam w Tabeli 7.

Najmniejszą wartość różnorodności haplotypowej (h) odnotowałam dla populacji BIE, w której wyniosła ona $0,330 \pm 0,044$, natomiast największą wartość h ($0,776 \pm 0,035$) stwierdziłam w populacji GWL (Tabela 11). Różnorodność nukleotydowa wahała się w przedziale od $0,587 \pm 0,340$ (pop. PAU) do $1,412 (\%) \pm 0,769$ (pop. SRO). Liczba miejsc polimorficznych wyniosła od 11 (pop. MSZ) do 21 (pop. KPN). Średnia liczba różnic między parami porównywanych sekwencji zawierała się w przedziale od $3,565 \pm 1,857$ (pop. PAU) do $8,574 \pm 4,169$ (pop. SRO; Tabela 11).

Testy D Tajimy (1989) były istotne statystycznie tylko dla populacji NPN i GWL, dla których uzyskałam dodatnie wartości testu (Tabela 11). Z kolei testy $D^* Fu$ i Li (1993) istotnie różniły się od zera w przypadku populacji BIE, PAU, PKN, MSZ, SRO i RDZ. Dla wszystkich populacji otrzymane wartości statystyki F_s (Fu 1997) nie były istotne statystycznie (Tabela 11).

Analizy 4 haplotypów z Litwy wykazały obecność 16 miejsc polimorficznych, różnorodność haplotypowa wyniosła $0,714 \pm 0,081$, natomiast różnorodność nukleotydowa – $0,791 (\%) \pm 0,459$. Statystyki D Tajimy (1989), $D^* Fu$ i Li (1993) oraz $F_s Fu$ (1997) nie były istotne statystycznie. Wyniki opisanych powyżej statystyk zostały przedstawione w Tabeli 11.

Średnie zróżnicowanie genetyczne dla mtDNA-cr między analizowanymi populacjami było bardzo duże ($\Phi_{ST} = 0,25$, $P < 0,001$) i duże ($F_{ST} = 0,22$; $P < 0,001$) oraz istotnie różniło się od zera, co w konsekwencji oznacza bardzo ograniczony poziom przepływu genów w linii żeńskiej. Dla 76% par porównywanych populacji (Φ_{ST}) i aż dla 92% takich par (F_{ST}) otrzymałam wartości zróżnicowania genetycznego istotne statystycznie ($P < 0,001$; Tabela 14). Generalnie, nie różniły się między sobą populacje, w których z bardzo wysoką frekwencją występował haplotyp „biebrzański” H1 (pop. BIE, MSZ, KWD i LDZ) oraz populacje zlokalizowane wzdłuż wschodniej granicy Polski (pop. PAU, PKN, PPN oraz LIT). Wartości Φ_{ST} (uwzględniając tylko te istotne statystycznie) między parami 14 populacji wahały się od 0,09 (pop. PAU vs PKN, PKN vs NPN) do 0,62 (pop. PAU vs MSZ), natomiast wartości F_{ST} zawierały się w przedziale od 0,07 (pop. PAU vs SRO) do 0,59 (pop. BIE vs KPN; Tabela 14). Wartości zróżnicowania genetycznego (Φ_{ST}) $\geq 0,25$ wykazałam dla 58% porównywanych par oraz dla 45% par populacji, dla których wyznaczyłam dystans F_{ST} (uwzględnione tylko wartości istotnie różne od zera).

Sekwencje regionu kontrolnego mtDNA łosi stanowiących próby muzealne

Analizy odcinka regionu kontrolnego mtDNA o długości 351 par zasad u 92 łosi odstrzelonych w latach 1987 – 1994 pozwoliły mi zidentyfikować w badanym materiale 10 haplotypów mtDNA-cr. Z frekwencją równą 0,01 odnotowałam obecność haplotypów H12, H13, H18 i H20 (Tabela 8). Do najczęstszych haplotypów z tego okresu należał natomiast, podobnie jak w materiale współczesnym, haplotyp „biebrzański” H1, stwierdzony z frekwencją 0,40 oraz haplotyp „fiński” H2, który wystąpił z frekwencją 0,37. Haplotyp H18 znaleziony w populacji PKN_M, we współczesnych próbach, wśród których znalazłam 12 haplotypów mtDNA-cr, nie został przeze mnie zidentyfikowany. W materiale muzealnym nie znalazłam z kolei trzech współcześnie występujących haplotypów – H6, H10 i H22 (Tabela 8). Różnorodność haplotypowa (h) w próbie 92 osobników wyniosła $0,702 \pm 0,030$, zaś różnorodność nukleotydowa (π) $1,632$ (%) $\pm 0,873$ (Tabela 12). W grupie 10 haplotypów zidentyfikowałam 22 miejsca polimorficzne, spośród których wszystkie miały charakter tranzycji. Średnia liczba różnic między parami porównywanych sekwencji wyniosła $5,729 \pm 2,769$ (Tabela 12).

W poszczególnych populacjach liczba haplotypów wahała się od 3 (pop. BIE_M) do 6 (pop. NNU_M; Tabela 12). Haplotyp „biebrzański” H1 był najczęstszym haplotypem w populacji BIE_M i sąsiadujących z nią PKN_M oraz NNU_M, natomiast haplotyp „fiński” H2 miał największą frekwencję w populacjach MAZ_M i BPD_M (Tabela 8). Różnorodność haplotypowa (h) wahała się od $0,492 \pm 0,117$ (pop. BIE_M) do $0,809 \pm 0,059$ (pop. BPD_M), zaś różnorodność nukleotydomowa (π) od $1,403 (\%) \pm 0,808$ (pop. BIE_M) do $1,759 \pm 0,989$ (pop. NNU_M). Liczba miejsc polimorficznych zawierała się w zakresie od 15 (pop. PKN_M i BPD_M) do 19 (pop. NNU_M), a średnia liczba różnic nukleotydowych między parami porównywanych sekwencji wyniosła od $4,925 \pm 2,531$ (pop. BIE_M) do $6,175 \pm 3,098$ (pop. NNU_M).

Istotnie statystycznie wartości zróżnicowania genetycznego stwierdziłam dla 40% (Φ_{ST}) oraz dla 30% (F_{ST}) par porównywanych populacji. Wartości zróżnicowania genetycznego (Φ_{ST}) między 5 porównywanymi populacjami (uwzględniając tylko te istotne statystycznie) wahały się od 0,11 (pop. NNU_M vs BPD_M) do 0,25 (pop. BIE_M vs BPD_M), natomiast wartości F_{ST} od 0,10 (pop. PKN_M vs BPD_M) do 0,21 (pop. BIE_M vs BPD_M; Tabela 15). W przypadku współczynnika Φ_{ST} , istotnie w mtDNA różniły się od siebie populacje BPN_M vs MAZ_M, BIE_M vs BPD_M, PKN_M vs BPD_M oraz NNU_M vs BPD_M (Tabela 15). Natomiast dla F_{ST} były to następujące pary populacji: BIE_M vs MAZ_M, BIE_M vs BPD_M i PKN_M vs BPD_M. Zarówno w oparciu o Φ_{ST} , jak i w F_{ST} nie znalazłam różnic w mtDNA dla następujących par populacji: BIE_M vs PKN_M, BIE_M vs NNU_M, PKN_M vs MAZ_M, PKN_M vs NNU_M, MAZ_M vs NNU_M oraz MAZ_M vs BPD_M (Tabela 15).

Sekwencje genu cytochromu b mtDNA

Sekwencje genu cytochromu *b* mtDNA o długości 1 140 par zasad odczytałam i dopasowałam u 20 osobników łośi. Wyboru osobników do analiz genetycznych dokonałam w oparciu o kryterium posiadania przez te osobniki różnych haplotypów mtDNA-cr (607 pz). Przedstawiony sposób wyboru prób pozwolił mi zsekwencjonować po jednym osobniku posiadającym haplotypy mtDNA-cr: H2, H6, H13, H17, H20 i H22, po dwa osobniki o haplotypach mtDNA-cr: H3, H10, H11 i H12 oraz po 3 osobniki o haplotypach mtDNA-cr: H1 i H4. Łącznie wykryłam cztery warianty genetyczne cytochromu *b*, którym nadane zostały następujące numery GenBank: KC337270 –

KC337273 (Świsłocka i wsp. 2013a). Haplotyp H1-*cytb* wystąpił u wszystkich osobników posiadających następujące warianty mtDNA-cr: H1, H10, H12, H13 i H20 (gałąź Biebrza i Polesie), haplotyp H2-*cytb* znalazłam u osobników z haplotypami mtDNA-cr: H2, H3 i H4 (klad Ural), haplotyp H3-*cytb* stwierdziłam u osobników z wariantami mtDNA-cr H6 i H11 (gałąź Fennoscandia reprezentowana przez łosie w Szwecji – H6 i rzadki wariant – H11 obecny w populacji KPN i na Białorusi), natomiast H4-*cytb* posiadały osobniki z mtDNA-cr: H17 i H20 (gałąź Fennoscandia utworzona przez osobniki występujące w okolicach Obwodu Kaliningradzkiego; Rycina 3 i 6). Przedstawione powyżej klady i gałęzie drzewa filogenetycznego zostały szczegółowo opisane w kolejnym podrozdziale zatytułowanym „*Drzewa filogenetyczne i sieci haplotypów*”. Poszczególne haplotypy cytochromu *b* zidentyfikowałam na podstawie obecności pięciu substytucji, spośród których wszystkie miały charakter tranzycji. Haplotyp H1-*cytb* różnił się od haplotypu H2-*cytb* i haplotypu H3-*cytb* odpowiednio dwiema oraz trzema mutacjami, natomiast dwie tranzycje oddzielały haplotypy H3-*cytb* i H4-*cytb*. Sekwencje nukleotydowe genu cytochromu *b* przepisałam następnie w programie Mega v.5.05 na sekwencje białkowe i stwierdziłam, że wszystkie pięć znalezionych substytucji ma charakter synonimiczny (*dS*), a więc nie powodują one zmiany sekwencji aminokwasów w białku kodowanym przez analizowany gen. Z kolei, jedną niesynonimiczną substytucją różnił się wariant genetyczny cytochromu *b* łosia z haplogrupy Azjatyckiej (GenBank nr JF489131) od dwóch pozostałych sekwencji cytochromu *b* zidentyfikowanych u łosi azjatyckich (Gen Bank nr AY035872 i AY035872) oraz od czterech znalezionych przeze mnie wariantów cytochromu *b* łosi z haplogrupy Europejskiej.

Drzewa filogenetyczne i sieci haplotypów

Przed etapem konstrukcji drzewa metodą maksymalnego prawdopodobieństwa (*ML*) oraz metodą wnioskowania *bayesowskiego*, dla poszczególnych markerów molekularnych wyznaczyłam w programie jModelTest (Posada 2008) najbardziej optymalne modele substytucji nukleotydowej:

1) dla mtDNA-cr (607 pz) – model HKY +I:

$-\ln L = 1123,182$; $k = 59$; frekwencja adeniny (f_A) = 0,343; frekwencja cytozyny (f_C) =

0,202; frekwencja guaniny (fG) = 0,120; frekwencja tyminy (fT) = 0,334; proporcja liczby tranzycji do transwersji (T_Z/T_V) = 16,320;

2) dla cytochromu *b* mtDNA (1 140 pz) – model HKY:

$-\ln L = 1679,49$; $k = 16$; frekwencja adeniny (fA) = 0,308; frekwencja cytozyny (fC) = 0,264; frekwencja guaniny (fG) = 0,130; frekwencja tyminy (fT) = 0,298; proporcja liczby tranzycji do transwersji (T_Z/T_V) = 20,025;

3) dla mtDNA (mtDNA-cr + cytochrom *b*; 1 747 pz) – model HKY + G + I:

$-\ln L = 2741,774$; $k = 30$; frekwencja adeniny (fA) = 0,318; frekwencja cytozyny (fC) = 0,246; frekwencja guaniny (fG) = 0,130; frekwencja tyminy (fT) = 0,307; proporcja liczby tranzycji do transwersji (T_Z/T_V) = 85,409.

Do konstrukcji drzew metodą łączenia sąsiadów (*NJ*) wykorzystałam z kolei model Kimury (*K80*; Kimura 1980), który spośród zestawu modeli dostępnych w programie Mega najbardziej odpowiada przedstawionym wyżej modelom wyznaczonym w programie jModelTest.

Drzewa filogenetyczne linii mtDNA skonstruowane za pomocą metody łączenia sąsiadów (*NJ*), maksymalnego prawdopodobieństwa (*ML*) oraz metody wnioskowania bayesowskiego dla haplotypów mtDNA-cr o długości 607 par zasad jednoznacznie wskazują, że 12 wykrytych przeze mnie wariantów genetycznych mtDNA-cr u łośi należy do haplogrupy Europejskiej tego gatunku, po raz pierwszy opisanej przez Hundertmarka i wsp. (2002a). W analizowanym materiale nie stwierdziłam występowania haplotypów łośi należących do haplogrupy Azjatyckiej. Topologia drzew wykonanych metodą *NJ* oraz *ML* była identyczna, w związku z tym na jednej rycinie, której podstawę stanowiła topologia *NJ*, naniosałam istotne wartości wskaźnika poparcia *bootstrap*, wyrażone w procentach, uzyskane dla drzewa *NJ* i *ML* (Rycina 3). Wykryte przeze mnie warianty europejskie tworzą na tych drzewach dwa kłady (*BS* = 87%). Pierwszy z nich, który nazwany został przeze mnie kładem Centralna Europa (Świsłocka i wsp. 2013a), grupuje haplotypy H1, H6, H10, H11, H12, H13, H17, H20 i H22. W skład tego kładu wszedł również haplotyp opisany przez Hundertmarka i wsp.(2002a) o numerze GenBank AF412259, znaleziony u łośi pochodzących z Dalekiego Wschodu. Drugi kład, nazwany został Ural (Świsłocka i wsp. 2013a), z uwagi na fakt, iż w jego skład wchodzi haplotypy łośi wykryte przez Hundertmarka i wsp. (2002a) między innymi na Uralu (GenBank nr: AF412231 – H4, AF412232 – H2, AF412233 – H3, AF412253, AF412254, AF412261

oraz AF412266). Warty odnotowania jest fakt, że w obrębie kładu Centralna Europa zaistniał wyraźny podział na trzy gałęzie/grupy, potwierdzony wysokimi wartościami wskaźnika *BS* (zakres wartości *BS*: 84 – 99%; Rycina 3). Pierwsza grupa, złożona z trzech haplotypów: H1, H10 i H13, nazwana została Biebrza, z uwagi na miejsce znalezienia haplotypu H1 w dolinie Biebrzy. W obrębie drugiej grupy, Polesie, znalazły się haplotypy H12 i H20. Natomiast trzecia grupa, Fennoscandia, skupia haplotypy (H6, H11, H17 i H22), wśród których znalazł się między innymi haplotyp „kampinoski” H11, wykazujące powiązania z ze szwedzkim wariantem genetycznym H6 oraz haplotypy H17 i H22 znalezione przede wszystkim w Srokwie, a więc w bliskim sąsiedztwie Obwodu Kaliningradzkiego.

Topologia drzewa wnioskowania *bayesowskiego*, dla której nie zamieściłam ryciny w niniejszej rozprawie, również sugeruje podział haplotypów europejskich na dwa klady, Centralna Europa i Ural, przy czym w obrębie kładu Centralna Europa występuje inny sposób grupowania haplotypów. Z prawdopodobieństwem *a posteriori* wynoszącym 1 wyróżniona została grupa Biebrza, w skład której weszły haplotypy H1, H10 i H13. Grupa Fennoscandia, oprócz haplotypów H6 i H11, zgrupowała również haplotypy H12 i H20, tworzące na drzewie *NJ* i *ML* grupę Polesie. Natomiast haplotypy H17 i H22 zostały potraktowane jako trzecia gałąź (prawdopodobieństwo *a posteriori* wynoszące 1).

Konstrukcja drzew filogenetycznych metodą łączenia sąsiadów oraz maksymalnego prawdopodobieństwa dla mtDNA-cr o długości 351 par zasad, pozwoliła mi, przy wykorzystaniu różnych technik, uzyskać taki sam obraz, w związku z czym, zdecydowałam się na przedstawienie w niniejszej pracy topologii drzewa *NJ*, na którym zaznaczone zostały jedynie istotne wartości *BS* uzyskane metodą *ML* (Rycina 4). Drzewo filogenetyczne dla mtDNA-cr o długości 351 par zasad, mimo że skonstruowane na krótszym niemal o połowę odcinku sekwencji mtDNA, przez co teoretycznie nastąpiła utrata znacznej części informacji genetycznej, w pełni oddało topologię drzew *NJ* oraz *ML* utworzonych dla mtDNA-cr o długości 607 par zasad. 10 znalezionych przeze mnie haplotypów należy do haplogrupy Europejskiej, w której zaznaczył się podział na wymienione wcześniej trzy grupy/gałęzie (Biebrza, Polesie, Fennoscandia). Co więcej, analiza ta wykazała, że w obrębie grupy Biebrza istniał jeszcze jeden haplotyp – H18, którego we współczesnych próbach nie stwierdziłam (Rycina 4).

Analizę pokrewieństw filogenetycznych wykonałam również dla odcinka genu cytochromu *b* o długości 1 140 par zasad. Za pomocą metody *NJ*, *ML* oraz wnioskowania bayesowskiego ze 100% poparciem udokumentowałam rozdział na haplogrupę właściwą dla łośi europejskich, w skład której weszły 4 znalezione przeze mnie warianty, gdzie razem zgrupowały się haplotypy H1-*cytb* i H2-*cytb* oraz H3-*cytb* i H4-*cytb*. Mimo że w sekwencji kodującej cytochrom *b* stwierdziłam niski poziom zmienności, to jednak jest on wystarczający, by bezbłędnie zidentyfikować przynależność haplotypów *cytb* do poszczególnych kładów oraz grup filogenetycznych mtDNA: H1-*cytb* do grupy Biebrza i Polesie, H2-*cytb* do kładu Ural, natomiast H3-*cytb* i H4-*cytb* do gałęzi Fennoscandia. W związku z tym, że przy wykorzystaniu trzech metod konstrukcji drzewa filogenetycznego otrzymałam taki sam obraz, w niniejszej rozprawie zamieściłam tylko topologię drzewa *NJ* z naniesionymi dodatkowo istotnymi wartościami *BS* uzyskanymi przy zastosowaniu metody *ML* (Rycina 5).

Aby w pełni wykazać istnienie dwóch kładów w obrębie haplogrupy Europejskiej, potwierdzić jej rozdział na trzy gałęzie: Biebrza, Polesie i Fennoscandia oraz wyjaśnić niejednoznaczne do końca położenie haplotypów H12, H17, H20 i H22 skonstruowałam drzewo *NJ*, *ML* oraz wnioskowania bayesowskiego w oparciu o połączone sekwencje mtDNA-cr i cytochromu *b* (łączy odcinek o długości 1 747 pz). Otrzymane różnymi metodami topologie drzew w pełni potwierdziły występowanie dwóch kładów – Centralna Europa i Ural w obrębie haplogrupy Europejskiej wraz z wysokimi wskaźnikami poparcia *bootstrap* (Rycina 6) oraz prawdopodobieństwa *a posteriori*, wskazującymi na bardzo wysokie prawdopodobieństwo ich odrębnej historii ewolucyjnej. W obrębie kładu Centralna Europa potwierdził się wyraźny podział na trzy gałęzie. Istnienie grupy Polesie, skupiającej haplotypy H12 i H20 zostało poparte trzema metodami, natomiast haplotypy H17 i H22 wraz z H6 i H11 utworzyły dychotomiczną gałąź Fennoscandia. W niniejszej pracy przedstawiłam topologię drzewa utworzonego z wykorzystaniem metody *NJ*, podając jednocześnie istotne wartości współczynnika *BS* uzyskane dzięki zastosowaniu metody *ML* (Rycina 6).

Sieć filogenetyczna wykonana w oparciu o 12 sekwencji mtDNA-cr połączonych z cytochromem *b* mtDNA wskazała także na istnienie dwóch kładów: Centralna Europa oraz Ural (Rycina 7). W obrębie pierwszego kładu zaznaczył się wyraźny podział na trzy gałęzie/grupy: Biebrza, utworzonej przez trzy haplotypy: H1, H10 i H13, Polesie,

skupiającej warianty H12 i H20 oraz Fennoscandia z haplotypami H6, H11, H17 i H22. Kład Ural utworzyły z kolei haplotypy H2, H3 i H4 (Rycina 7). Haplotyp H1 różni się 11 mutacjami od najbliższego haplotypu (H11) z gałęzi Fennoscandia oraz 13 mutacjami od najbliższego haplotypu (H3 i H4) z kładu Ural. Z kolei haplotypy „uralskie” H3 i H4 od najbliższego haplotypu z gałęzi Fennoscandia (H11) dzieli 10 mutacji. Na przedstawionej sieci widać, jak bardzo różny w mtDNA jest wariant genetyczny łośia należącego do haplogrupy Azjatyckiej (GenBank nr JN632595). Aż 30 mutacjami różni się on od najbliższego haplotypu z grupy Polesie (H20), 31 substytucjami od najbliższych haplotypów z kładu Ural (H2 i H3) i grupy Fennoscandia (H11) i 34 miejscami polimorficznymi od haplotypu H1 z grupy Biebrza.

Datowanie zdarzeń ewolucyjnych

Dywergencja netto (Da) sekwencji mtDNA-cr (607 pz) między kładem Centralna Europa i Ural wyniosła 0,7% ($\pm 0,3$ SE). Natomiast między gałęziami kładu Centralna Europa wartości Da przedstawiają się następująco: Biebrza i Polesie – 1,0% ($\pm 0,4$ SE), Biebrza i Fennoscandia – 1,3% ($\pm 0,4$ SE), Polesie i Fennoscandia – 0,8% ($\pm 0,3$ SE). Przy założeniu tempa mutacji dla regionu kontrolnego mtDNA u Cervidae rzędu 4 – 8% na 1 mln lat i 2% na 1 mln lat dla cytochromu *b* (Randi i wsp. 1998) wynik ten oznacza, że kład Centralna Europa oddzielił się od kładu Ural blisko 138 000 lat temu (95% C.I.: 81 208 – 205 400), natomiast łośie z gałęzi Biebrza różnicowały się od łośi z grupy Fennoscandia około 130 000 lat temu (95% C.I.: 73 807 – 195 800). W związku z brakiem danych na temat tempa mutacji dla regionu kontrolnego mtDNA u łośia, wyliczyłam również czas rozdzielenia się poszczególnych kładów i grup ewolucyjnych w obrębie kładu Centralna Europa zakładając tempo mutacji dla mtDNA-cr uzyskane dla bydła domowego (Bradley i wsp. 1996). Według tych wyliczeń łośie z kładu Centralna Europa oddzieliły się od kładu Ural około 47 570 lat temu (95% C.I.: 28 225 – 69 491), natomiast gałąź Biebrza od gałęzi Fennoscandia – 46 780 lat temu (95% C.I.: 26 009 – 69 441).

Rozkład liczby niedopasowań nukleotydowych (ang. mismatch distribution)

Wykresy przedstawiające rozkład liczby niedopasowań nukleotydowych wykonane w oparciu o mtDNA-cr (607 pz) dla 13 populacji z Polski (haplotypy H1, H2, H3, H4, H6, H10, H11, H12, H13, H17, H20 i H22), kladu Centralna Europa (haplotypy H1, H6, H10, H11, H12, H13, H17, H20 i H22) oraz gałęzi Biebrza (haplotypy H1, H10 i H13) i Fennoscandia (haplotypy H6, H11, H17 i H22) przedstawiłam na Rycinach 13 – 16. Parametry opisujące ekspansję demograficzną i przestrzenną: Tau (τ), Theta0 (θ_0), Theta1 (θ_1), *SSD* (wartość testu najmniejszych kwadratów) oraz indeks *raggedness* przedstawiłam w Tabeli 30. Rozkłady niedopasowań nukleotydowych przyjęły obraz multimodalny dla próby z Polski złożonej z 13 populacji, obraz bimodalny dla haplotypów należących do kladu Centralna Europa i gałęzi Fennoscandia, natomiast jednomodalny, w kształcie litery „L” i wykazujący przesunięcie w kierunku zera w przypadku gałęzi Biebrza. Taki sam obraz otrzymałam dla gałęzi Biebrza w oparciu o analizy wykonane na czterech haplotypach mtDNA-cr o długości 351 par zasad: H1, H10, H13 i H18. Uzyskany wynik pozwolił mi wyliczyć czas ekspansji demograficznej i przestrzennej dla gałęzi Biebrza. Przy założeniu tempa mutacji dla mtDNA-cr (607 pz) rzędu 4%/1mln lat (Randi i wsp. 1998) ekspansja demograficzna gałęzi Biebrza miała miejsce blisko 8 826 lat temu (95% C.I.: 982,58 – 10 296,54), natomiast ekspansja przestrzenna około 320 lat temu (95% C.I.: 182,40 – 4 601,08). Uwzględniając z kolei tempo mutacji rzędu 8%/1mln lat dla mtDNA-cr (Randi i wsp. 1998) ekspansja demograficzna gałęzi Biebrza nastąpiła 4 413 lat temu (95% C.I.: 491,29 – 5 148,27), z kolei przestrzenna około 160 lat temu (95% C.I.: 91,20 – 2 300,54). W przypadku wyliczeń czasu ekspansji demograficznej wartość Tau (τ) wyniosła 3,0 (95% C.I.: 0,334 – 3,5), indeks *raggedness* = 0,393 ($P = 0,651$), $\theta_0 = 0$ (95% C.I.: 0 – 0,007), $\theta_1 = 0,267$ (95% C.I.: 0 – 99999), *SSD* = 0,002 ($P > 0,05$; Tabela 30), wartość testu *D* Tajima (1989) -1,975 ($P < 0,001$), która wskazuje na istotny sygnał ekspansji demograficznej oraz *F_s Fu* (1997) -1,312 ($P = 0,254$). Dla ekspansji przestrzennej Tau (τ) = 0,109 (95% C.I.: 0,062 – 1,564), *SSD* = 0,001 ($P > 0,05$), $\theta = 0,100$ (95% C.I.: 0,001 – 0,149; Tabela 30).

Analizy przeprowadzone w oparciu o odcinek mtDNA-cr o długości 351 par zasad przy założeniu tempa mutacji rzędu 4%/1mln lat (Randi i wsp. 1998) sugerują, że ekspansja demograficzna gałęzi Biebrza zaszła blisko 15 262 lat temu (95% C.I.: 2 065,53

– 17 806,27), natomiast przestrzenna około 463 lat temu (95% C.I.: 320,51 – 4 217,54). Z kolei przy uwzględnieniu tempa mutacji rzędu 8%/1mln lat (Randi i wsp. 1998), okazuje się, że ekspansja demograficzna grupy Biebrza miała miejsce około 7 631 lat temu (95% C.I.: 1 032,76 – 8 903,13), a przestrzenna blisko 232 lata temu (95% C.I.: 160,26 – 2 108,77). Dla ekspansji demograficznej wartość Tau (τ) wyniosła 3,0 (95% C.I.: 0,406 – 3,5), indeks *raggedness* = 0,432 ($P = 0,657$), $\theta_0 = 0$ (95% C.I.: 0 – 0,009), $\theta_I = 0,240$ (95% C.I.: 0 – 99999), *SSD* = 0,001 ($P > 0,05$; Tabela 30), wartość testu *D* Tajima (1989) -0,898 ($P > 0,05$) oraz *F_s* Fu (1997) -2,067 ($P = 0,169$). W przypadku ekspansji przestrzennej Tau (τ) = 0,091 (95% C.I.: 0,063 – 0,829), *SSD* = 0,001 ($P > 0,05$), $\theta = 0,131$ (95% C.I.: 0,001 – 0,112; Tabela 30).

Zmienność genetyczna populacji losi w 11 loci mikrosatelitarnego DNA

Ze względu na znaczne częstości alleli zerowych z analiz usunęłam loci BL42 i CSM003, gdyż uwzględnienie ich w obliczeniach w dużym stopniu mogłoby zaniżać obserwowaną heterozygotyczność i wpłynąć na inne parametry z zakresu genetyki populacji, takie jak między innymi wartości *F_{ST}*. Dla pozostałych 11 loci frekwencja alleli zerowych była akceptowalna (Tabela 20), w związku z czym poddane zostały one szczegółowym analizom statystycznym. W locus OarFCB193 zgenotypowałam 100% osobników, w pozostałych loci niezgenotypowane osobniki stanowiły od 0,3% (locus BM1258) do 16,8% (locus BM1225; Tabela 19). We wszystkich zbadanych loci mikrosatelitarnego DNA wykryłam umiarkowaną lub wysoką zmienność, diagnozując ogółem 119 alleli (Tabela 21). Liczba alleli w poszczególnych loci była średnia lub duża i wahała się od 7 (locus BM1258) do 15 (locus BM4513; Tabela 19). Frekwencję alleli w analizowanych loci, oszacowaną dla połączonej próby 386 osobników pochodzących z 14 populacji, zawarłam w Tabeli 21. Mimo obserwowanej wysokiej liczby alleli, frekwencja około połowy z nich (52%) okazała się być niższa niż 0,05. Liczba alleli prywatnych (*N_p*), tj. alleli unikalnych tylko dla danej populacji wyniosła 7, z czego po 2 stwierdziłam w populacji KPN i PPN (locus OarFCB193: w pop. NPN allel 108 oraz w pop. KWD allel 110; locus RT5: w pop. PPN allel 160; locus BM4513: w pop. KPN allel 137; locus MAF70: w pop. KPN allel 156 oraz locus McM58: w pop. BIE allel 197 i w pop. PPN allel 216). W analizowanych populacjach średnia liczba alleli przypadająca

na locus (N_A) wahała się od 5,55 (pop. MSZ) do 8,73 (pop. BIE; Tabela 22). W całej próbie osiągnęła ona wartość 10,82. Dla poszczególnych loci mikrosatelitarnego DNA liczba alleli w badanych populacjach łosi przedstawiała się w zakresie od 4 (pop. MSZ, MRG, SRO, KWD, LIT) do 13 (pop. KPN). Heterozygotyczność obserwowana (H_O) w poszczególnych populacjach była wysoka i wyniosła od 0,594 (pop. MSZ) do 0,779 (pop. PAU; Tabela 22). Wartości heterozygotyczności oczekiwanej (H_E) były zbliżone do H_O i wahały się od 0,710 (pop. MSZ) do 0,786 (pop. PAU; Tabela 22).

Nie wykazałam istnienia korelacji (współczynnik korelacji Pearsona, r) między heterozygotycznością obserwowaną (H_O), a szerokością geograficzną ($r = 0,330$; $P = 0,270$) i długością geograficzną ($r = -0,270$; $P = 0,372$), między średnią liczbą alleli przypadającą na locus (N_A) a szerokością geograficzną ($r = -0,471$; $P = 0,105$) i długością geograficzną ($r = 0,296$; $P = 0,327$) oraz między maksymalną liczbą alleli w populacjach, a szerokością geograficzną ($r = -0,388$; $P = 0,190$) i długością geograficzną ($r = 0,065$; $P = 0,832$).

Analizy wykazały istotne statystycznie odchylenia od równowagi Hardy'ego-Weinberga w 10 populacjach łosi: BIE, PAU, PKN, NPN, KWD, GWL, KPN, RDZ, PPN i LIT (Tabela 22). Wartości współczynnika wsobności (F_{IS}) wahały się od 0,003 (pop. SRO) do 0,207 (pop. PKN) i były istotnie różne od zera w populacjach: BIE, PKN, KPN i PPN (Tabela 22). W całej próbie współczynnik F_{IS} wyniósł 0,086 (95% C.I.: 0,064 – 0,106).

Średnie zróżnicowanie genetyczne dla 11 loci mikrosatelitarnych między 14 populacjami łosi było małe, lecz istotnie różniło się od zera ($F_{ST} = 0,03$; $P < 0,01$). Oznacza to, że poziom przepływu genów między populacjami dla osobników obu płci jest tylko nieznacznie ograniczony. Dla zdecydowanej większości porównywanych par populacji (80,22%) uzyskałam wartości F_{ST} istotne statystycznie. Spośród 19,78% nieistotnych wartości F_{ST} , blisko połowa związana była z porównaniami dotyczącymi populacji PKN. Wartości F_{ST} (uwzględnione tylko te istotne statystycznie) między parami porównywanych populacji dla loci mikrosatelitarnych wahały się od 0,01 (pop.: BIE vs PAU, BIE vs KWD, BIE vs RDZ) do 0,25 (pop. LIT vs PPN; Tabela 17). Aż 90% otrzymanych porównań między populacjami pod względem parametru F_{ST} było równe lub niższe od 0,05, co oznacza małe zróżnicowanie genetyczne między nimi. Dla 40% porównywanych par populacji otrzymałam istotnie różne od zera wartości współczynnika

R_{ST} , które zawierały się w przedziale od 0,02 (pop. BIE vs KPN, PAU vs KPN, BIE vs PPN i PAU vs PPN) do 0,08 (porównania populacji KWD z PAU, SRO i KPN; Tabela 17). Spośród istotnie różnych od zera wartości R_{ST} aż dla 61% porównywanych par populacji uzyskałam wartości równe lub niższe od 0,05.

Pokrewieństwo genetyczne

Przeprowadzone w programie Kingroup v.2 i Kinship analizy wartości średniego pokrewieństwa między osobnikami wykonane dla poszczególnych populacji oraz dla całej próby 386 osobników wykazały, że wartości współczynnika pokrewieństwa (r) nie były istotnie wyższe od zera (Tabela 23). Oznacza to, że analizowane osobniki w populacjach nie były ze sobą spokrewnione. W przypadku obu zastosowanych programów otrzymałam praktycznie identyczne wartości współczynnika r , dlatego też zdecydowałam się w Tabeli 23 zamieścić wartości r wyliczone tylko w jednym z nich – Kingroup v.2. Dla całej puli osobników ($N = 386$) wartość współczynnika r wyniosła -0,003 i statystycznie różniła się od zera (95% C.I.: -0,021 – 0,018). Z porównania wszystkich par osobników w poszczególnych populacjach wynika, że zdecydowaną większość (od 78,10 % w pop. KWD do 94,93% w pop. BIE) stanowiły osobniki niespokrewnione. W populacji MRG nie stwierdziłam występowania osobników reprezentujących układ rodzic – potomek (Tabela 23). Najwięcej osobników należących do tej kategorii pokrewieństwa znalazłam w populacji SRO (4,41%). Z kolei par pełnego rodzeństwa nie stwierdziłam w populacjach SRO i LIT, podczas gdy w populacji KWD znalazłam 4,76% par osobników należących do tej kategorii. Najwyższy udział par reprezentujących pół-rodzeństwo odnotowałam w populacji KWD (6,66%). Uwzględniając poszczególne kategorie pokrewieństwa (rodzic – potomek, pełne rodzeństwo, pół-rodzeństwo, kuzyni), zauważyłam, że najczęściej, a mianowicie od 3,55% (pop. BIE) do 7,62% (pop. KWD) par porównywanych osobników stanowili kuzyni (Tabela 23). W całej próbie, obejmującej 386 osobników pochodzących z 13 populacji z Polski i 1 populacji z Litwy zaledwie 0,23% wszystkich par osobników stanowiły pary rodzic – potomek, 0,31% pary pełnego rodzeństwa, 0,50% pary pół-rodzeństwa, a 4,95% pary kuzynów. Aż 94,01% wszystkich par porównywanych osobników nie była ze sobą spokrewniona.

Izolacja przez dystans

Analizy zależności między zróżnicowaniem genetycznym pomiędzy populacjami łośi w Polsce, a dzielącym je dystansem geograficznym (izolacja przez dystans) wykonane w programie Isolation by Distance Web Service (IBDWS; Jensen i wsp. 2005) zarówno dla sekwencji mtDNA-cr, jak i 11 loci mikrosatelitarnego DNA wykazały, że za wzrost zróżnicowania genetycznego nie odpowiada dystans geograficzny dzielący populacje (mtDNA-cr: $R^2 = 0,003$; $P = 0,332$; mikrosatelitarny DNA: $R^2 = 0,010$; $P = 0,238$).

Graficzna wizualizacja zróżnicowania między populacjami

Wizualizację potencjalnego grupowania populacji wykonałam dla mtDNA-cr (607 pz) oraz dla 11 loci mikrosatelitarnego DNA, wykorzystując analizę składowych głównych (PCA).

W oparciu o matrycę wartości Φ_{ST} dla mtDNA-cr otrzymałam graficzny obraz, w którym pierwsza składowa główna (PC1) tłumaczy 61,90%, natomiast druga składowa główna (PC2) 23,52% zmienności układu (razem PC1 i PC2 tłumaczą 85,42% zmienności układu; Rycina 9). Trzecia składowa główna uzasadnia 7,97% zmienności. Na podstawie uzyskanej wizualizacji wyróżniłam cztery grupy populacji. Pierwsza grupa złożona jest z populacji, w których najczęściej występującym wariantem genetycznym mtDNA-cr jest „biebrzański” H1 (pop. BIE, MSZ, KWD i LDZ). W skład drugiej grupy weszły populacje zlokalizowane wzdłuż wschodniej granicy Polski, łącznie z populacją z Litwy (pop. PAU, PKN, PPN i LIT). Populacje te charakteryzują się znacznym udziałem osobników posiadających „fińskie” haplotypy mtDNA-cr: H2 i H3. Trzecia grupa została utworzona przez populacje NPN, MRG, SRO i GWL. Wyraźnie odrębną pod względem składowej PC2 okazała się populacja KPN, której odmienność jest efektem powstania na drodze udanej reintrodukcji pięciu osobników z Białorusi. Ilustrację graficzną wyników analizy składowych głównych wykonanej z wykorzystaniem matrycy wartości Φ_{ST} dla mtDNA-cr przedstawia Rycina 9.

Analiza PCA przeprowadzona dla mtDNA-cr w oparciu o matrycę wartości F_{ST} pozwoliła uzyskać obraz, w którym pierwsza składowa główna tłumaczy 53,17%, druga składowa główna – 25,56% i trzecia składowa główna – 9,37% zmienności układu (Rycina

10). Składowe główne PC1 i PC2 wyjaśniają łącznie 78,73% całkowitej zmienności. Analiza PCA wskazała na istnienie wyraźnych, genetycznie odrębnych grup populacji. Pierwszą grupę, podobnie jak w przypadku analizy PCA wykonanej na podstawie matrycy Φ_{ST} , utworzyły populacje, w których dominował „biebrzański” haplotyp H1 mtDNA-cr (pop. BIE, MSZ, KWD i LDZ). W drugiej grupie znalazły się populacje występujące wzdłuż wschodniej (pop. PAU, PKN i PPN) i północnej granicy Polski (pop. SRO), jak również populacja z Litwy. Populacje NPN i MRG, wykazujące charakter mieszany utworzyły grupę trzecią. Względem PC2 wyraźnie odmienne okazały się populacje z Polski Centralnej: GWL i RDZ, ze znacznie obiegającą od nich populacją KPN, której odrębność jest skutkiem wspomnianego wcześniej efektu założyciela. Ilustrację graficzną wyników analizy składowych głównych w oparciu o matrycę wartości F_{ST} dla mtDNA-cr przedstawia Rycina 10.

Na podstawie matrycy wartości R_{ST} wykonałam również analizę PCA dla 11 loci mikrosatelitarnego DNA. W otrzymanym obrazie grupowania populacji pierwsza składowa główna tłumaczy 49,43%, druga składowa główna – 21,58% i trzecia składowa główna – 15,39% zmienności układu (Rycina 11). 71,01% zmienności jest więc wyjaśnione przez obie składowe główne PC1 i PC2. Uzyskana wizualizacja wskazuje, że względem składowej PC1 populacje BIE, PAU, SRO, KPN i RDZ są wyraźnie różne od pozostałych populacji. Z kolei, druga składowa główna PC2 ukazuje odrębność populacji KWD. Wyróżniona została również grupa populacji o mieszańcowym pochodzeniu, zlokalizowanych wzdłuż wschodniej granicy Polski: PKN, NPN oraz PPN. Opisane grupowanie populacji zostało zwizualizowane graficznie na Rycinie 11.

Analiza PCA przeprowadzona na bazie matrycy wartości F_{ST} dla 11 loci mikrosatelitarnego DNA, w której składowa główna pierwsza i druga tłumaczą 62,76% zmienności układu (PC1 – 46,10%, PC2 – 16,66%), pozwoliła mi uzyskać obraz odpowiadający takiemu samemu grupowaniu populacji, jak w przypadku analiz wykonanych w oparciu o matrycę R_{ST} . W związku z tym, postanowiłam w niniejszej rozprawie nie zamieszczać ryciny dla analizy PCA wykonanej dla 11 loci mikrosatelitarnych w oparciu o matrycę F_{ST} .

Analiza wariancji molekularnej (AMOVA) i identyfikacja genetycznie odrębnych grup populacji

Analiza wariancji molekularnej (AMOVA) bazująca na sekwencjach mtDNA-cr (607 pz) dla 13 populacji z Polski przy założeniu istnienia jednej grupy pokazała, że najwięcej zmienności (67,33%; $P < 0,001$) występuje wewnątrz populacji, natomiast między populacjami zmienność była o połowę mniejsza (32,67%; $P < 0,001$; Tabela 24). Wartość współczynnika Φ_{ST} wyniosła 0,33 i była istotna statystycznie ($P < 0,001$). W przypadku analizy AMOVA wykonanej w oparciu o genotypy osobników pochodzących z 13 populacji z Polski wyznaczone w 11 loci mikrosatelitarnego DNA, zdecydowaną większość zmienności (97,64%; $P < 0,001$) zidentyfikowałam również wewnątrz populacji (Tabela 24). Między populacjami zmienność była niewielka i wyniosła odpowiednio 2,36%. Współczynnik F_{ST} osiągnął wartość 0,02 i istotnie różnił się od zera ($P < 0,001$). Podobne wyniki otrzymałam, gdy do analiz razem z populacjami z Polski włączyłam populację z Litwy. Wyniki analizy AMOVA wykonane dla mtDNA-cr i 11 loci mikrosatelitarnego DNA przy założeniu występowania jednej grupy przedstawiłam w Tabeli 24.

Analiza wariancji molekularnej wykonana w programie SAMOVA ver. 1.0 zarówno w oparciu o sekwencje mtDNA-cr jak i 11 loci mikrosatelitarnego DNA w celu określenia najbardziej prawdopodobnej liczby genetycznie różnych grup populacji (od $K = 2$ do $K = 8$) z uwzględnieniem ich geograficznej lokalizacji, wskazała na istnienie 7 grup. Przy tej ilości grup populacji różnice między grupami wyznaczone w SAMOVIE były największe, natomiast zmienność wewnątrz grup była najmniejsza. W przypadku sekwencji mtDNA-cr podział populacji na poszczególne grupy przedstawia się następująco: grupa I – pop. BIE i populacje z Mazur: MSZ, MRG i LDZ, grupa II – pop: PAU i LIT, grupa III – pop. PKN i PPN, grupa IV – pop. NPN i GWL, grupa V – pop. SRO, grupa VI – pop. KWD oraz grupa VII – pop. KPN i RDZ. Przy założeniu 7 grup genetycznie różnych populacji, większość zmienności wykryłam wewnątrz populacji (64,47%; $P < 0,001$) i między grupami (32,92%; $P < 0,001$; Tabela 25). Między populacjami wewnątrz grup zmienność stanowiła zaledwie 2,61%. Wartości współczynników statystyki Φ były istotne statystycznie ($P < 0,001$) i wyniosły odpowiednio: 0,33 (Φ_{CT}), 0,04 (Φ_{SC}) i 0,36 (Φ_{ST} ; Tabela 25).

Grupowanie populacji w 11 loci mikrosatelitarnego DNA wygenerowane przez program SAMOVA przedstawia się następująco: grupa I – pop. BIE i PAU, grupa II – pop. PKN, LDZ, GWL, PPN i LIT, grupa III – pop. NPN, grupa IV – pop. MSZ i MRG, grupa V – pop. SRO, grupa VI – pop. KWD, oraz grupa VII – pop. KPN i RDZ. Niemal całą zmienność (96,63%), zidentyfikowałam wewnątrz populacji (Tabela 25). Wartości współczynników statystyki F : F_{CT} (0,04) i F_{ST} (0,034) były istotne statystycznie.

Wykonując analizy w programie Structure v.2.3.3, które miały na celu określenie, ile niezależnych grup genetycznych stanowią osobniki łośi, otrzymałam wartości logarytmu prawdopodobieństwa ($LnP(K)$) uzyskania określonej liczby grup genetycznie zróżnicowanych populacji (K) na podstawie wyjściowych danych empirycznych. Pierwsza wartość, przy założeniu, że zestaw osobników stanowi jedną populację ($K = 1$) wyniosła $LnP(K) = -13763,4$, natomiast wariancja $Var[LnP(K)] = 54,2$ (Tabela 26). Najbardziej prawdopodobną liczbą grup genetycznie zróżnicowanych populacji łośi jest $K = 2$ ($LnP(K) = -13637,4$; $Var[LnP(K)] = 375,7$; Tabela 26). W Tabeli 27 przedstawiłam udział osobników z poszczególnych populacji łośi w każdej z dwóch grup genetycznie zróżnicowanych populacji. Wydaje się, że do grupy I należą przede wszystkim osobniki z rodowodem wschodnim, natomiast do grupy II łośie wywodzące się z reliktowej populacji biebrzańskiej.

Przepływ genów między populacjami i identyfikacja migrantów

W celu określenia różnic w poziomie efektywnej dyspersji samic i samców łośi porównałam wartości średniego zróżnicowania genetycznego w mtDNA-cr ze zróżnicowaniem genetycznym w 11 autosomalnych loci mikrosatelitarnych. Porównanie między wszystkimi 14 analizowanymi populacjami nie dałoby wiarygodnego określenia różnic w dyspersji samic i samców, ponieważ regułą jest większe zróżnicowanie linii mtDNA niż genów jądrowych. Do porównania wybrałam 11 par populacji, najczęściej zlokalizowanych w bliskim sąsiedztwie, między którymi zróżnicowanie genetyczne (F_{ST}) w mtDNA-cr wahało się od 0,01 (pop. MSZ i LDZ oraz LDZ i KWD) do 0,28 (pop. LDZ i GWL), natomiast F_{ST} w 11 loci mikrosatelitarnych zawierało się w przedziale od 0,01 (pop. PKN i NPN) do 0,05 (pop. PAU i SRO; Tabela 17). Średnia liczba migrantów Nm

w przypadku mtDNA-cr wyniosła 1,83, co odpowiada około 3 – 4 osobnikom wymienianym między dwiema populacjami na pokolenie, natomiast dla mikrosatelitarnego DNA $Nm = 8,1$, co oznacza swobodny przepływ genów między populacjami. Z analiz w mtDNA-cr wynika, że najmniejsze wartości Nm i M uzyskałam przy porównaniach populacji GWL z populacjami bezpośrednio z nią sąsiadującymi, tj. LDZ, KWD i KPN (Tabela 28). Między przedstawionymi parami populacji średnio wymieniane są od 1 do 2 osobników na pokolenie. Natomiast pary populacji LDZ i KWD oraz MSZ i LDZ są przykładem populacji, między którymi następuje swobodny przepływ genów zarówno w mtDNA, jak i w mikrosatelitarnym DNA (Tabela 28). W celu określenia poziomu przepływu genów między wybranymi populacjami w różnych markerach genetycznych, wyliczyłam proporcję średniej liczby migrantów określoną dla mikrosatelitarnego DNA i mtDNA-cr (Tabela 28). Wartości proporcji równe 0,2 i 0,3 otrzymane dla porównań populacji LDZ z populacjami, z którymi sąsiaduje bezpośrednio: MSZ i KWD, sugerują, że dyspersja samic jest większa, a w rzeczywistości, że populacje te zostały założone przez samice pochodzące z tego samego źródła. Z kolei, porównanie poziomu przepływu genów w różnych markerach między parami populacji GWL i KPN, PAU i MRG, LDZ i GWL oraz KWD i GWL wskazuje na zdecydowanie większą efektywną dyspersję samców (Tabela 28).

W programie GeneClass2 zidentyfikowałam 16 osobników, będących prawdopodobnymi migrantami pierwszego pokolenia (Tabela 29). Mimo że siła testów statystycznych w przypadku małego zróżnicowania genetycznego między populacjami ($F_{ST} = 0,03$) jest nieduża, program wykrył 4,14% ogółu osobników, dla których istniało bardzo małe prawdopodobieństwo ($P < 0,01$), że urodziły się w populacji, w której znajdowały się w momencie pobierania prób. W grupie stwierdzonych migrantów znalazło się 10 samic i 6 samców. Najwięcej migrantów, po trzech, pochodziło z populacji PAU, MSZ i RDZ. Z populacji BIE pochodził tylko jeden migrant, samiec, który został wykryty w populacji KPN. Analiza kierunków migracji osobników między populacjami pozwala zauważyć, że dominującym trendem jest dyspersja ze wschodu na zachód Polski. Dotyczy to aż 62,5% osobników (6 samic i 4 samców) migrujących między innymi z populacji NPN do MSZ, z populacji PAU do SRO i GWL, czy też z populacji MSZ do LDZ i GWL. Co ciekawe, w próbie tej znalazłam jedną samicę, która przywędrowała z Litwy do

populacji NPN. 31,25% osobników (4 samice i jeden samiec) podjęło wędrówkę w kierunku odwrotnym, tj. z zachodu na wschód Polski. Były to osobniki pochodzące z populacji zlokalizowanych w Polsce Północnej i Centralnej (pop. SRO, GWL i RDZ), które migrowały do populacji BIE (3 samice), oraz PKN (1 samiec) i PPN (1 samica). Tylko w przypadku jednego samca (6,25%) pochodzącego z populacji PAU, stwierdziłam kierunek migracji z północy na południe (do populacji PKN).

Sekwencje markerów zlokalizowanych na chromosomach Y i X

Odczyt zapisu sekwencji nukleotydowych siedmiu genów zlokalizowanych na chromosomie Y umożliwił mi analizę odcinków DNA o łącznej długości 2 348 par zasad (Tabela 3). Uzyskane fragmenty DNA okazały się specyficzne dla samców łośi i nie powieliły się w reakcji PCR u żadnej z badanych samic, które potraktowałam jako kontrolę negatywną. Sześć analizowanych genów z chromosomu Y okazało się monomorficznych, w efekcie czego stwierdziłam w każdym z nich tylko po jednym haplocie u wszystkich badanych byków: *DBY4* (GenBank nr KC337275), *DBY7* (GenBank nr KC337276), *DBY8* (nie nadany został numer sekwencji GenBank z uwagi na zbyt krótki fragment powielonego genu, ≤ 200 par zasad), *DBY9* (GenBank nr KC337277), *UTY11* (GenBank nr KC337278) i *SRY* (GenBank nr KC337274; Świsłocka i wsp. 2013a). Zaprojektowana przeze mnie para starterów *DBY9_alces* specyficznych dla łośia, nie potwierdziła obecności polimorfizmu w obrębie genu *DBY9*, stwierdzonego przy zastosowaniu starterów opracowanych przez Hellborg i Ellegren (2003). Startery YCATS są uniwersalne i zapewne dlatego elektroforegramy sekwencji *DBY9* u niektórych osobników były niejednoznaczne, wskazując na ewentualną możliwość istnienia pojedynczej mutacji. Natomiast kolejna zaprojektowana przeze mnie para starterów specyficznych dla łośia – *DBY14_alces*, jednoznacznie wskazała na obecność polimorfizmu w obrębie powielonego odcinka genu *DBY14* o długości 154 par zasad. Sekwencje genu *DBY14* otrzymałam dla 231 samców z 14 populacji z Polski, 8 byków z Litwy i 5 samców pochodzących łącznie z Białorusi, Finlandii, Szwecji i Syberii (Tabela 9). W locus *DBY14* stwierdziłam obecność 4 haplotypów, którym nadane zostały następujące numery GenBank: KC337279 – KC337282 (Świsłocka i wsp. 2013a). Pojedynczymi mutacjami o charakterze transwersji różniły się haplotypy H1-*DBY14* i H2-*DBY14* oraz H2-*DBY14* i H4-*DBY14*. Dwa miejsca

polimorficzne dzieliły haplotypy H1-*DBY14* i H3-*DBY14* (2 tranzycje), H1-*DBY14* i H4-*DBY14* (2 transwersje) oraz H2-*DBY14* i H3-*DBY14* (po jednej tranzycji i transwersji). Z kolei cztery mutacje, dwie tranzycje i dwie transwersje, odróżniały haplotypy H3-*DBY14* i H4-*DBY14*.

Najczęstszy haplotyp dla odcinka *DBY14*, w każdej analizowanej populacji był zawsze ten sam – H1-*DBY14* i wystąpił z frekwencją od 0,88 (pop. KPN) do 1,00 – dla większości populacji (Tabela 9). Haplotyp H2-*DBY14* stwierdziłam w populacjach: BIE, BIE_M, KPN i NNU_M (Tabela 9). Tylko w populacjach PKN i KPN wystąpił wariant H3-*DBY14*. Niezwykle zaskakujący okazał się również fakt, że w populacji KPN znalazłam aż cztery haplotypy *DBY14*, z czego haplotyp H4-*DBY14* nigdzie poza populacją KPN nie został przeze mnie stwierdzony. Co ciekawe, u samców spoza obszaru Polski, a mianowicie z Litwy, Białorusi, Finlandii, Syberii i Szwecji wystąpił tylko jeden, najczęstszy w Polsce wariant H1-*DBY14*. Frekwencje czterech haplotypów w odcinku *DBY14* dla samców należących do 14 populacji z Polski oraz dwóch populacji spoza granic naszego kraju przedstawiłam w Tabeli 9. Statystyki *D* Tajimy (1989), *D** Fu i Li (1993) oraz *F_s* Fu (1997), które opracowałam w oparciu o wszystkie sekwencje genu *DBY14* uzyskane dla samców z Polski potraktowanych jako jedna próba, były nieistotne statystycznie (*D* = -1,497, *P* > 0,05; *D** = -0,441, *P* > 0,05; *F_s* = -4,120, *P* > 0,05).

Wartości zróżnicowania genetycznego dla 15 par populacji łośi (nie uwzględniłam pojedynczych prób z Białorusi, Finlandii, Syberii i Szwecji) pod względem markera *DBY14*, wyrażone jako wartości Φ_{ST} i F_{ST} , przyjęły zakres od zera do 0,09 (pop. PKN vs populacje z Mazur – MAZ i MAZ_M), przy czym wszystkie nieistotnie różniły się od zera (Tabela 16), co oznacza brak różnic między populacjami łośi pod względem frekwencji haplotypów specyficznych dla chromosomu Y.

Dysponując czterema sekwencjami genu *DBY14* dla łośi, jedną sekwencją uzyskaną dla sarny europejskiej i syberyjskiej (H5; Świsłocka, dane niepubl.) oraz sekwencjami pobranymi z GenBanku dla bawołu domowego (H6), bizona (H7), gaura, (H8) i bydła domowego (H9) skonstruowałam sieć filogenetyczną (Rycina 8). Na otrzymanej sieci powiązań zauważamy, że wszystkie haplotypy łośi H1-*DBY14* – H4-*DBY14* grupują się w jeden kład razem z haplotypem znalezionym u sarny europejskiej i syberyjskiej. Haplotyp H1-*DBY14* różni się trzema substytucjami od wariantu posiadanego przez oba gatunki sarny (2 tranzycje i 1 transwersja), haplotyp H2-*DBY14*

dziela od wariantu genetycznego H5 saren cztery mutacje (2 tranzycje i 2 transwersje), H3-*DBY14* posiada trzy mutacje względem wariantu H5 (2 tranzycje, 1 transwersja), natomiast pięć mutacji (2 tranzycje i 3 transwersje) odróżnia H4-*DBY14* od haplotypu H5 sarny europejskiej i syberyjskiej. Haplotypy bizona i bydła zgrupowały się razem w kolejny kład, natomiast bardzo różny od nich, jak i od sekwencji łośi i saren, okazał się haplotyp bawołu domowego (Rycina 8).

Sekwencje fragmentu intronu genu *Zfx* o długości 523 par zasad odpowiadające intronowi znajdującemu się między 9 a 10 egzonom tego genu, uzyskałam dla 11 samic pochodzących z populacji BIE, MRG i KPN, jednej samicy ze Szwecji i dla 13 samców z populacji: BIE, NPN, KPN i PPN. W próbie 25 osobników stwierdziłam występowanie tylko jednego wariantu genetycznego H1-*Zfx*, w związku z czym nie kontynuowałam analiz genetycznych na większej próbie osobników.

Sekwencje genu *MHC II DRB*

W próbie 196 zgenotypowanych osobników z Polski i 16 z Litwy zidentyfikowałam dziewięć alleli genu *MHC II DRB*, spośród których siedem zostało do tej pory opisanych przez Mikko i Anderssona (1995) oraz przez Udinę i wsp. (2002) dla łośi z Europy, Dalekiego Wschodu i Ameryki Północnej: *DRB1*1* (GenBank nr X82398), *DRB1*2* (GenBank nr X83278), *DRB1*3* (GenBank nr X83279), *DRB1*4* (GenBank nr X83280), *DRB1*5* (GenBank nr X83281), *DRB1*8* (GenBank nr X83284) i *DRB1*9* (GenBank nr X83285). Stwierdziłam występowanie dwóch nowych, niezalezionych do tej pory u łośi alleli, którym nadałam odpowiednie numery: *DRB1*11* i *DRB1*12*. Wśród analizowanych 212 osobników zidentyfikowałam 62 homozygoty i 150 heterozygot. Liczba stwierdzonych alleli w populacjach wahała się od 5 (pop. PAU, PKN i MRG) do 8 (pop. BIE; Tabela 10). Allele *DRB1*4* i *DRB1*11* wystąpiły jedynie w populacji BIE, natomiast allel *DRB1*12* został znaleziony tylko w populacji LIT. Do najczęściej stwierdzanych alleli należały trzy allele: *DRB1*1*, *DRB1*3* i *DRB1*9*, które stwierdziłam we wszystkich populacjach z frekwencją wahającą się od 14% do 50%. Frekwencje alleli w locus *MHC II DRB* w poszczególnych populacjach przedstawiłam w Tabeli 10.

Różnorodność haplotypowa (h) w poszczególnych populacjach wahała się od $0,725 \pm 0,104$ (pop. MRG) do $0,802 \pm 0,047$ (pop. LIT), zaś różnorodność nukleotydowa (π) od $1,391 (\%) \pm 0,860$ (pop. MRG) do $1,637 \pm 0,939$ (pop. PAU). Podstawowe statystyki opisujące zmienność genu *MHC II DRB* w 8 populacjach oraz w całej próbie opisałam w Tabeli 13. Testy D Tajimy (1989), D^* Fu i Li (1993) oraz F_s (Fu 1997) dla wszystkich sekwencji genu *MHC II DRB* potraktowanych jako jedna próba, nie różniły się istotnie od zera ($D = 3,843, P > 0,05$; $D^* = -0,140, P > 0,05$; $F_s = 5,514, P > 0,05$).

Analizy wykonane w programie LOSITAN (Antao i wsp. 2008), który umożliwia wyznaczenie związku pomiędzy współczynnikiem Wright'a F_{ST} i heterozygotycznością oczekiwaną (H_E), pozwoliły stwierdzić, że różnice we frekwencji alleli genu *MHC II DRB* między populacjami łośi nie wynikają z działania doboru pozytywnego (Rycina 17). Jako tło genetyczne w tych obliczeniach wykorzystałam 11 loci mikrosatelitarnych, na które z założenia nie powinien działać dobór naturalny. Uzyskany wynik wskazuje, że locus *MHC II DRB* może podlegać wpływowi doboru równoważącego, który faworyzuje heterozygoty i utrzymuje różnorodność alleli ($P = 0,06$). Nie wykazałam istnienia korelacji między liczbą alleli *MHC II DRB*, a średnią liczbą alleli w 11 loci mikrosatelitarnych (N_A) w poszczególnych populacjach łośi (współczynnik korelacji Pearsona $r = 0,385$; $P = 0,348$).

Zaledwie dla 11% (Φ_{ST} , zakres od 0,04 do 0,07) i 18% (F_{ST} , zakres od 0,03 do 0,07) par porównywanych populacji otrzymałam wartości zróżnicowania genetycznego istotne statystycznie ($P < 0,001$; Tabela 18). W przypadku Φ_{ST} wartości istotnie różne od zera, które według skali Wrighta (1978) oznaczają małe i umiarkowane zróżnicowanie genetyczne, otrzymałam przy porównaniach populacji SRO z populacjami KPN, PPN i LIT (odpowiednio: 0,04, 0,07 i 0,06). Natomiast wartości istotne dla współczynnika F_{ST} uzyskałam przede wszystkim dla porównań populacji BIE z populacjami MRG, SRO, KPN, PPN (odpowiednio: 0,07, 0,04 i 0,03) oraz dla pary SRO vs PPN (0,03).

Analiza PCA przeprowadzona na bazie matrycy wartości F_{ST} wskazała, że dwie składowe główne wyjaśniają łącznie 94,39% zmienności układu (PC1: 69,10%, PC2: 25,29%). Analiza ta potwierdziła, że reliktowa populacja łośi w dolinie Biebrzy, także w markerze molekularnym MHC jest odrębna od pozostałych populacji (Rycina 12). Populacje SRO i MRG pod względem wartości PC1 znacznie różnią się od populacji BIE

i PAU, które dodatkowo pod względem PC2 są inne od populacji KPN i PPN oraz PKN i LIT. Populacje KPN i PPN wydają się wykazywać charakter mieszańcowy.

Charakterystyka reliktywnej populacji łośi w dolinie Biebrzy – zestawienie najważniejszych wyników

W populacji łośi z doliny Biebrzy stwierdziłam występowanie czterech wariantów genetycznych mtDNA-cr: H1 oraz „fińskich” haplotypów H2, H3 i H4 (Tabela 7). Uwzględniając fakt, że próba reprezentująca populację biebrzańską była największa ($N = 155$), zidentyfikowana liczba haplotypów wydaje się być niska w porównaniu z populacjami zdecydowanie mniej licznymi, takimi jak MRG, SRO, GWL i KPN, w których wystąpiło po sześć haplotypów mtDNA-cr (Tabela 7 i 11). Znajduje to swoje potwierdzenie w wartościach różnorodności haplotypowej ($h = 0,330 \pm 0,044$) oraz różnorodności nukleotydowej ($\pi = 0,654 \pm 0,364$), które w populacji biebrzańskiej były jednymi z najniższych w porównaniu do pozostałych populacji łośi w Polsce (Tabela 11). Najczęstszym w populacji biebrzańskiej, z frekwencją równą 0,81, okazał się haplotyp mtDNA-cr H1, natomiast spośród haplotypów „fińskich” najwyższą frekwencję, równą 0,14, odnotowałam dla wariantu H2. Haplotyp H1 różni się 13 mutacjami od haplotypu H2, 11 mutacjami od wariantu H4 i 9 miejscami polimorficznymi od haplotypu H3. Natomiast warianty „fińskie” różnią się między sobą 4 (H3 i H4) lub 6 podstawieniami (H2 i H3 oraz H2 i H4). Osobniki posiadające warianty „fińskie” są najprawdopodobniej imigrantami lub potomkami imigrantów, którzy dotarli do doliny Biebrzy przez północną bądź wschodnią granicę naszego kraju. Jednakże w populacji w dolinie Biebrzy taki wschodni rodowód posiada zaledwie co piąty osobnik. Analiza łośi pozyskanych z doliny Biebrzy z okresu polowań w latach 1987 – 1994 wykazała, że w populacji tej występowały tylko trzy haplotypy mtDNA-cr: H1 z frekwencją równą 0,69, „fiński” wariant H2 (frekwencja 0,25) oraz należący do gałęzi Fennoscandia haplotyp H17 (frekwencja 0,06), który współcześnie znalazłam jedynie w populacjach z Polski Północnej i Centralnej (pop. SRO i KWD; Tabela 7 i 8). Analiza czasowa pozwala więc stwierdzić, że w głównej mierze w dolinie Biebrzy występowały i nadal występują osobniki posiadające unikalny haplotyp H1, co wydaje się być wynikiem redukcji liczebności populacji biebrzańskiej i jej długotrwałej izolacji przestrzennej od ciągłego zasięgu gatunku. Od momentu

wprowadzenia *moratorium*, a więc w okresie ostatnich 12 lat pojawiły się natomiast w dolinie Biebrzy imigranci posiadający haplotypy „fińskie” H3 i H4, których w próbach muzealnych z tego obszaru nie stwierdziłam.

Haplotyp H1 jest unikalnym wariantem genetycznym łośi europejskich, należącym do kladu Centralna Europa, który wydaje się być jednym z bardziej zróżnicowanych w stosunku do swoich europejskich odpowiedników, co ilustrują drzewa i sieć filogenetyczna (Ryciny 3 – 7). Jest on śladem pozostawionym przez autochtoniczną populację łośi, która zasiedliła obszar doliny Biebrzy po szczycie ostatniego zlodowacenia. Haplotyp ten, razem z haplotypami H10 i H13 oraz haplotypem H18 zidentyfikowanym wyłącznie w materiale muzealnym (Tabela 8), tworzy wyodrębnioną na drzewie filogenetycznym gałąź Biebrza. Haplotyp H18, którego obecności nie potwierdziłam w populacjach współczesnych, najprawdopodobniej był bardzo rzadkim wariantem genetycznym, który w materiale muzealnym wystąpił jedynie w populacji PKN_M z niską frekwencją (0,06).

Reliktowy charakter populacji w dolinie Biebrzy zidentyfikowany w mtDNA potwierdzają również analizy innych markerów molekularnych. W populacji biebrzańskiej występują dwa warianty genetyczne odcinka *DBY14* zlokalizowanego na chromosomie Y (Tabela 9). Obok haplotypu H1-*DBY14*, będącym najczęściej stwierdzanym u łośi wariantem tego genu, zidentyfikowałam również haplotyp H2-*DBY14*, który wystąpił w grupie osobników pozyskanych łowiecko w latach 1987 – 1994, jak również w populacji analizowanej współcześnie. Warto podkreślić fakt, że haplotyp ten, z wyjątkiem populacji reintrodukowanej w Kampinoskim Parku Narodowym, w innych współczesnych populacjach łośi z Polski nie został odnaleziony. Nie stwierdziłam go również u samców spoza obszaru Polski, mianowicie z Litwy, Białorusi, Finlandii, Szwecji i Syberii. Haplotyp H2-*DBY14* może być kolejnym śladem pozostawionym przez samce wywodzące się z populacji autochtonicznej, która skolonizowała dolinę Biebrzy po ustąpieniu ostatniego zlodowacenia.

W populacji biebrzańskiej zidentyfikowałam największą liczbę alleli genu *MHC II DRB* (Tabela 10). Spośród ośmiu wykrytych alleli, dwa – *DRB1*4* i *DRB1*11* nigdzie w Polsce poza doliną Biebrzy nie wystąpiły. Co warto podkreślić, allel *DRB1*11* jest unikalny dla populacji biebrzańskiej w skali światowej i poza nią nie został stwierdzony. Ciekawy jest również fakt, że allel *DRB1*4*, który wystąpił w populacji biebrzańskiej, do

tej pory zidentyfikowany był w reliktowej populacji łośi w Szwecji (Mikko i Andersson 1995), oraz w rosyjskiej części zasięgu występowania łośia (Udina i wsp. 2002). Spośród ośmiu alleli *MHC II DRB* znalezionych u łośi biebrzańskich, aż cztery: *DRB1*2*, *DRB1*4*, *DRB1*5* i *DRB1*11* utrzymywane są w tej populacji z bardzo niską frekwencją, wahającą się od 0,01 do 0,04 (Tabela 10).

Unikalność populacji biebrzańskiej potwierdzają także analizy mikrosatelitarnego DNA, które wykazały, że w populacji tej występuje najwyższa średnia liczba alleli w poszczególnych loci (N_A ; Tabela 22).

Zaskakujące okazały się porównania zróżnicowania genetycznego pomiędzy populacją biebrzańską a pozostałymi populacjami łośi w Polsce. Duże oraz bardzo duże i istotnie różne od zera wartości Φ_{ST} i F_{ST} dla mtDNA-cr odnotowałam przy porównaniach populacji BIE z populacjami zlokalizowanymi w jej bezpośrednim sąsiedztwie, mianowicie dla populacji PAU, PKN i NPN, jak też w przypadku populacji znacznie od niej oddalonych: populacje SRO, GWL, KPN, RDZ, PPN i LIT (Tabela 14). Tylko w przypadku porównań populacji BIE z populacjami MSZ, KWD (ale nie dla wartości F_{ST}) i LDZ otrzymałam wartości zróżnicowania genetycznego równe zero ($P > 0,05$), świadczące o swobodnym przepływie genów mitochondrialnych między nimi. Tego wyraźnie ograniczonego przepływu genów, sugerującego izolację populacji biebrzańskiej, jaka zidentyfikowałam w linii żeńskiej między populacją BIE, a pozostałymi populacjami łośi nie potwierdziłam w przypadku przepływu genów dziedziczonych po obojgu rodzicach. Zróżnicowanie genetyczne między populacją biebrzańską, a pozostałymi populacjami w 11 loci mikrosatelitarnego DNA było małe ($F_{ST} \leq 0,05$), jednak aż 85% porównań istotnie różniło się od zera (Tabela 17).

Subpopulacje łośi w basenie górnym, środkowym i dolnym doliny Biebrzy

Po uwzględnieniu podziału doliny Biebrzy na baseny, okazało się, że w subpopulacji łośi żyjących na terenie basenu górnego wystąpiły trzy haplotypy mtDNA-cr: H1, H2 i H3, natomiast w subpopulacjach występujących na terenie basenu środkowego i dolnego zidentyfikowałam po cztery haplotypy (H1 – H4; Tabela 7). Co ciekawe, frekwencja haplotypu „biebrzańskiego” H1 rośnie z północy na południe doliny, w efekcie czego, haplotyp ten znalazłam aż u 93% łośi występujących na terenie basenu dolnego

i u zaledwie 30% osobników pochodzących z basenu górnego. Z kolei „fiński” haplotyp H2 posiadał co drugi łoś pochodzący z obszaru basenu górnego i zaledwie co dwudziesty łoś wywodzący się z subpopulacji zamieszkującej basen dolny. Podobną zależność wykazałam dla haplotypu H4, który z frekwencją 0,18 (u co czwartego łośia) wystąpił w subpopulacji z basenu górnego, a z frekwencją 0,01 w subpopulacji pochodzącej z basenu dolnego (Tabela 7).

Podział doliny Biebrzy na poszczególne baseny wskazuje, że zarówno najmniejsza wartość różnorodności haplotypowej ($h = 0,130 \pm 0,044$), jak i nukleotydowej ($\pi = 0,258 \pm 0,172$) wystąpiła w subpopulacji łośi z obszaru basenu dolnego, podczas gdy najwyższą wartość różnorodności haplotypowej i nukleotydowej stwierdziłam w subpopulacji z basenu górnego (Tabela 11). W przypadku subpopulacji z basenu górnego uzyskałam dodatnie i istotne statystycznie wartości testu D Tajimy (1989) oraz testu D^* Fu i Li (1993; Tabela 11).

Analizy 11 loci mikrosatelitarnego DNA wykazały, że najmniejsza średnia liczba alleli w poszczególnych loci wystąpiła w subpopulacji łośi pochodzącej z obszaru basenu górnego ($N_A = 4,91$), natomiast największa ($N_A = 7,91$) w subpopulacji z basenu dolnego (Tabela 22). W subpopulacji z basenu górnego także wartość heterozygotyczności obserwowanej ($H_O = 0,558$) była najmniejsza, podczas gdy w subpopulacjach z pozostałych dwóch basenów wartości H_O były bardzo wysokie (0,737 – basen środkowy; 0,734 – basen dolny; Tabela 22). Wysoką i istotnie różną od zera wartość wskaźnika F_{IS} stwierdziłam w subpopulacji łośi z basenu górnego ($F_{IS} = 0,250$; $P < 0,00032$; Tabela 22). Ciekawy wydaje się fakt, że właśnie w tej subpopulacji zidentyfikowałam najwyższy procent osobników spokrewnionych ze sobą, czy to w kategorii pełnego rodzeństwa (7,69%), pół-rodzeństwa (9,23%), czy też kuzynów (10,77%; Tabela 23). Z kolei, w subpopulacjach łośi z basenu środkowego i dolnego osobniki niespokrewnione ze sobą stanowiły odpowiednio 94,44% i 97,48%.

Porównanie zróżnicowania genetycznego między subpopulacjami łośi z poszczególnych basenów doliny Biebrzy wskazało na ograniczony przepływ genów w mtDNA pomiędzy nimi. Średnie wartości zróżnicowania genetycznego ($\Phi_{ST} = 0,09$; $P < 0,05$) zidentyfikowałam między subpopulacjami z basenu dolnego i środkowego, natomiast duże ($\Phi_{ST} = 0,23$; $P < 0,05$) i bardzo duże oraz istotne statystycznie ($\Phi_{ST} = 0,59$; $P < 0,05$) wartości zróżnicowania genetycznego stwierdziłam dla porównań subpopulacji

z odpowiednio basenu środkowego i górnego oraz dolnego i górnego. Natomiast w przypadku analiz 11 loci mikrosatelitarnych wartości F_{ST} otrzymane dla porównań subpopulacji łośi zamieszkujących poszczególne baseny wyniosły w każdym przypadku 0,01 i nie były istotne statystycznie ($P > 0,05$).

DYSKUSJA

W krótkim wprowadzeniu do dyskusji chciałabym odnieść się do zasady „zgodności genealogicznej” (ang. *genealogical concordance*), określającej stopień zgodności pomiędzy niezależnymi cechami genetycznymi lub zestawami danych (Awise i Ball 1990; Awise 2009), której założenia umożliwią mi poprawną interpretację wyników zawartych w niniejszej rozprawie.

Genealogiczna zgodność dowodem na głęboką filogeograficzną strukturę populacji

Podział populacji charakteryzujący się obecnością struktury genealogicznej w skali lokalnej lub znacznymi nieciągłościami w rozmieszczeniu linii mtDNA w obrębie zasięgu gatunku został odnotowany dla ogromnej liczby gatunków zwierząt i roślin (Awise 2008). Tylko w nielicznych przypadkach zidentyfikowano bardzo małe różnice lub całkowity brak zróżnicowania w obszarze zasięgu występowania gatunków, przy czym przykłady takie stanowią raczej wyjątki niż regułę. Jednym z powszechnie znanych odkryć stało się stwierdzenie, że grupy populacji reprezentujące ten sam gatunek, a występujące w różnych regionach, często charakteryzuje głęboki (ang. *deep*) rozdział genealogiczny, w porównaniu z płytkim (ang. *shallow*) rozdziałem genealogicznym mtDNA, zazwyczaj obserwowanym w obrębie każdej z takich grup (Awise 2008, 2009). Takie wyraźne grupy filogenetyczne reprezentujące linie maczyne wyróżnione w obrębie gatunku określane są jako ESU lub jako „wewnątrzgatunkowe grupy filogenetyczne” (Awise i Walker 1999). Rozmieszczenie takich grup jest w logiczny sposób powiązane z występowaniem znanych i domniemanych refugium glacialnych istniejących w plejstocenie oraz z trasami postglacialnej rekolonizacji gatunków. Generalnie, przestrzenne grupowanie się blisko spokrewnionych haplotypów mtDNA odzwierciedla współczesne ograniczenia dla przepływu genów, przynajmniej w linii żeńskiej. Z kolei głębsze podziały genetyczne, umożliwiające identyfikację jednostek ewolucyjnie istotnych, tj. ESU, są efektem znacznie dłuższego rozdziału populacji w sensie historycznym (Awise 2008, 2009).

Istotnym problemem pojawiającym się w filogeografii jest empiryczne odróżnienie struktury populacji wynikającej z dawnych zdarzeń historycznych od struktury płytkiej,

a więc relatywnie niedawnej. Rozwiązaniem tego dylematu, szczególnie w przypadku, gdy dysponujemy jedynie molekularnymi dowodami genetycznymi, jest odwołanie się do zasady „zgodności genealogicznej”, którą charakteryzują cztery główne aspekty (Avice i Ball 1990; Avice 2008, 2009).

Aspekt I – zgodność między wieloma cechami sekwencji w obrębie pojedynczego genu

Głęboki rozdział filogenetyczny oparty o genealogię jednego genu jest w jednoznaczny sposób rejestrowany przez wielokrotne, niezależne zmiany sekwencji w obrębie danej cząsteczki, pozwalające odróżnić jeden zestaw haplotypów od innego (Avice 2008, 2009). Aspekt I zgodności genealogicznej wykorzystuje kryterium ilościowe, zgodnie z którym wskaźniki statystyczne, między innymi współczynnik *bootstrap*, umożliwiają wyodrębnianie poszczególnych kładów na drzewie filogenetycznym za pomocą licznych cech, pozwalających uzyskać taki sam obraz. Znaczenie biologiczne aspektu I polega na tym, że akumulacja nowych mutacji pomiędzy różnymi liniami w obrębie genu, który nie podlega rekombinacji, jest procesem z reguły bardzo powolnym. Zgodnie natomiast z teoriami mutacji neutralnych i zegara molekularnego, im większa jest dywergencja między sekwencjami, tym dłuższy czas musiał upłynąć od momentu rozdzielenia się poszczególnych linii.

Aspekt II – między genealogami genów w obrębie danego gatunku

Aspekt II ma ogromne znaczenie w przypadku, gdy chcemy rozróżnić specyficzne genowo lub przestrzennie przypadkowe podziały genealogiczne, będące efektem między innymi izolacji przez dystans, od rozdziałów genealogicznych wywołanych odległymi w czasie zdarzeniami wikariancji, których efekty zazwyczaj oddziałują na cały genom (Avice 2008, 2009). Znaczenie biologiczne aspektu II związane jest z faktem, że potwierdzające się podziały na niezależnych drzewach genowych w obrębie rodowodu osobnika niemal z całkowitą pewnością reprezentują podstawowy rozdział filogenetyczny na poziomie populacji. A więc populacje współczesne, które umiejscowione są w zgodny sposób na niezależnych, podstawowych gałęziach drzew filogenetycznych wyznaczonych dla wielu różnych genów, najprawdopodobniej musiały rozejść się dawno temu.

Aspekt III – między współwystępującymi gatunkami

W sytuacji, gdy zasięg występowania kilku gatunków przynajmniej częściowo pokrywa się ze sobą, a analiza aspektów I i II umożliwiła zidentyfikowanie u tych gatunków głębokiej struktury filogeograficznej i potwierdziła, że podziały filogenetyczne

co najmniej po części odzwierciedlają rozmieszczenie przestrzenne i być może głębokość izolacji czasowej, jesteśmy w stanie uzasadnić aspekt III (Awise 2008, 2009). Biologiczne znaczenie tego aspektu opiera się na założeniu, że za ukształtowanie struktury genetycznej populacji współwystępujących ze sobą różnych gatunków odpowiadają podobne siły ewolucyjne. Aspekt III zgodności genealogicznej odnosi się między innymi do przestrzennego umiejscowienia genealogicznych kładów, określanych czasami jako wewnątrzgatunkowe „filogrupy”, odzwierciedlającego trasy kolonizacji z jednego lub kilku plejstocenijskich refugium glacialnych. W wielu przypadkach postglacialna ekspansja zasięgu doprowadziła do wytworzenia się między „filogrupami” stref wtórnego kontaktu zlokalizowanych w tak zwanych ‘*suture zone*’.

Aspekt IV – powiązanie między informacją genealogiczną a innymi informacjami biogeograficznymi

Aspekt IV związany jest z porównaniem danych molekularnych z tradycyjnymi dowodami z zakresu biogeografii, uzyskanymi za pomocą metod niegenetycznych (Awise 2008, 2009). Doskonałą ilustracją aspektu IV jest skład fauny i flory Europy, na podstawie którego możliwe jest wyznaczenie unikalnych wzorców dla poszczególnych gatunków, jak i ogólnych trendów we wzorcach filogeograficznych. Zarówno dane genetyczne, jak i tradycyjne potwierdzają występowanie w Europie niewielkiej liczby plejstocenijskich refugium glacialnych, przede wszystkim tak zwanych refugium „śroziemnomorskich”, które były głównym źródłem rekolonizacji Europy Północnej i Centralnej po wycofaniu się lodowca.

Charakterystyka linii filogenetycznych mtDNA u łosia

W analizowanej próbie łosia stwierdziłam występowanie 12 haplotypów mtDNA-cr (607 pz), wykazując, że zmienność u łosia w Polsce jest znacznie większa niż w pozostałych częściach jego europejskiego zasięgu występowania (Hundertmark i wsp. 2002a; Udina i wsp. 2002). Wszystkie zidentyfikowane przeze mnie warianty mtDNA-cr łosia należą do haplogrupy Europejskiej opisanej przez Hundertmarka i wsp. (2002a; Rycina 3). Nie stwierdziłam zarówno w Polsce, Niemczech jak i na Litwie osobników posiadających warianty genetyczne należące do haplogrupy Azjatyckiej (Hundertmark

i wsp. 2002a). Wyraźny podział na haplogrupę łośi Europejską i Azjatycką (Ryciny 3 – 7) poparty bardzo wysokimi wskaźnikami wartości *bootstrap* oraz prawdopodobieństwa *a posteriori*, jaki otrzymałam konstruując drzewa i sieć filogenetyczną wskazuje, że łośie należące do tych dwóch linii charakteryzują się odrębną i unikalną historią ewolucyjną. Izolacja tych dwóch grup łośi sprawiła, że wskutek dywergencji przez długi okres czasu stały się one odrębnymi jednostkami ważnymi z punktu widzenia procesów ewolucyjnych, identyfikowanymi jako ESU (Moritz 1994, 1995), które w pełni odpowiadają „wewnątrzgatunkowym grupom filogeograficznym” (Avice i Walker 1999). Lokalizacja takich jednostek ESU jest w logiczny sposób powiązana z historią geograficzną uwarunkowaną istnieniem znanych i domniemanych refugium w plejstocenie oraz z trasami postglacjalnej kolonizacji (Avice 2008).

W obrębie haplogrupy Europejskiej łośi widoczny jest wyraźny podział haplotypów mtDNA-cr na kład Centralna Europa i Ural (Rycina 3). Spośród 12 zidentyfikowanych wariantów mtDNA-cr tylko haplotypy „fińskie” H2, H3 i H4 należą do kładu Ural, pozostałe natomiast, stanowiące 75% opisanych w niniejszej rozprawie haplotypów mtDNA-cr, reprezentują wyodrębniony przeze mnie na podstawie analiz filogenetycznych kład Centralna Europa. Łosie posiadające haplotypy „uralskie” występują na przeważającym obszarze europejskiego zasięgu łośia, nie stwierdzono ich do tej pory jedynie w Szwecji (Hundertmark i wsp. 2002a; Udina i wsp. 2002). Podział haplogrupy Europejskiej na dwa klady filogenetyczne, poparty wysokimi wartościami wskaźnika *bootstrap* ($BS = 84\%$) i prawdopodobieństwa *a posteriori* wynoszącym 1 stanowi empiryczny dowód potwierdzający pochodzenie łośi europejskich z nie mniej niż dwóch różnych refugium glacialnych. Łosie „uralskie” szczyt ostatniego zlodowacenia (LGM) przetrwały najprawdopodobniej w refugium/refugiach, które zlokalizowane były we wschodniej części zasięgu występowania gatunku, natomiast łośie z kładu Centralna Europa przeżyły LGM zapewne w lokalnych refugiach europejskich. Klady Centralna Europa i Ural doświadczyły odrębnej i unikalnej historii ewolucyjnej, w związku z czym one także reprezentują odrębne jednostki ewolucyjnie istotne (ESU; Moritz 1994, 1995).

Kład Centralna Europa wyróżnia się podziałem na trzy gałęzie/grupy nazwane Biebrza (haplotypy H1, H10 i H13), Polesie (haplotypy H12 i H20) i Fennoscandia (haplotypy H6, H11, H17 i H22; Rycina 3; Świsłocka i wsp. 2013a). Występowanie osobników posiadających warianty genetyczne należące do grupy Biebrza i Polesie jest

ograniczone do obszaru Polski, z wyjątkiem jednego osobnika pochodzącego z Litwy, u którego stwierdziłam wariant H1. Z kolei osobniki, posiadające haplotypy wchodzące w skład gałęzi Fennoscandia, występują zarówno w Polsce, jak i w Szwecji (Hundertmark i wsp. 2002a), a najprawdopodobniej również na wschód od Polski, między innymi na Białorusi, skąd pochodziły łosie reintrodukowane do Puszczy Kampinoskiej, które pozostawiły po sobie wyraźnie widoczny ślad w postaci haplotypu H11 występującego u 13% łosi w naszym kraju.

W niniejszej rozprawie zaprezentowałam kilka rycin odzwierciedlających relacje filogenetyczne między haplotypami mtDNA u badanych przeze mnie łosi (Ryciny 3 – 6). Analizy filogenetyczne oparte zarówno o dłuższy (607 pz), jak i krótszy (351 pz) odcinek sekwencji mtDNA-cr pozwoliły uzyskać w pełni zgodny obraz pokrewieństwa filogenetycznego pomiędzy haplotypami mtDNA-cr. Zidentyfikowałam haplogrupę Azjatycką (z wykorzystaniem sekwencji z GenBanku) i Europejską, kłady europejskie Ural i Centralna Europa, a w obrębie tego ostatniego kładu gałęzie Biebrza, Polesie i Fennoscandia. Dysponując haplotypami mtDNA-cr o długości 607 par zasad i 351 par zasad wykazałam, że w ciągu ostatnich dwudziestu lat w obrębie gałęzi Biebrza miała miejsce redukcja liczby haplotypów, ponieważ haplotyp H18, zidentyfikowany przeze mnie w materiale muzealnym pochodzącym z lat 1987 – 1994, współcześnie w próbie 588 łosi pochodzących z Polski nie został wykryty. Z kolei, analizy filogenetyczne wykonane w oparciu o cztery warianty genetyczne cytochromu *b* mtDNA, różniące się bardzo niewielką liczbą podstawień nukleotydowych, umożliwiły jedynie wyróżnienie haplogrupy Europejskiej i Azjatyckiej. Różne zestawy danych genetycznych: mtDNA-cr (607 pz), mtDNA-cr (351 pz) i cytochrom *b* (1 140 pz), zgodnie z zasadą kongruencji i aspektem II „zgodności genealogicznej”, potwierdziły występowanie obu haplogrup łosi, dowodząc ich odrębnej historii ewolucyjnej i wykazując, że stanowią one oddzielne jednostki ewolucyjnie istotne, tj. ESU. Zasadę kongruencji potwierdza również fakt, że mimo iż zmienność w sekwencjach cytochromu *b* mtDNA nie jest zbyt duża, to jednak pozwala ona bezbłędnie identyfikować przynależność poszczególnych haplotypów *cytb* mtDNA do linii i kładów filogenetycznych mtDNA-cr (H1-*cytb* do gałęzi Biebrza i Polesie, H2-*cytb* do kładu Ural, H3-*cytb* do haplotypów H6 i H11 gałęzi Fennoscandia, natomiast H4-*cytb* do haplotypów H17 i H20 gałęzi Fennoscandia). Dodatkowo, wysoka wartość wskaźnika *bootstrap* (BS = 75%; Rycina 5) na drzewie odzwierciedlającym pokrewieństwo

filogenetyczne między haplotypami cytochromu *b* mtDNA pozwala wyróżnić haplotypy powiązane z wariantem H1 występującym w reliktovej populacji łośi w dolinie Biebrzy. Aby w pełni potwierdzić podział haplogrupy Europejskiej na kład Centralna Europa i Ural wykorzystałam połączone sekwencje mtDNA-cr (607 pz) i cytochromu *b* (1 140 pz), stosując je jako tak zwane dowody łączone (Rycina 6). Informacja zawarta w połączonych zestawach danych mtDNA w jednoznaczny sposób pozwoliła zidentyfikować kład Ural i Centralna Europa oraz gałęzie/grupy Biebrza, Polesie i Fennoscandia (Rycina 6). Podział na kład Ural i Centralna Europa poparty bardzo wysokimi wartościami współczynnika *bootstrap* ($BS = 98\%$ i 100%), potwierdza, że stanowią one oddzielne jednostki ewolucyjne, ESU.

Gałąź Biebrza utworzona jest przez haplotypy powiązane z wariantem H1, zidentyfikowanym w pilotażowych badaniach mtDNA u łośi bytujących w dolinie Biebrzy (Świsłocka i wsp. 2008). Haplotyp H1 jest unikalnym wariantem genetycznym łośi europejskich, który wydaje się być jednym z bardziej zróżnicowanych w stosunku do swoich europejskich odpowiedników, co ilustrują drzewa i sieć filogenetyczna (Ryciny 3 – 7). Gałąź Biebrza jest linią filogenetyczną, w składzie której znalazły się haplotypy H1, H10 i H13, różniące się między sobą zaledwie 1 lub 2 tranzycjami w połączonym odcinku mtDNA-cr i cytochromu *b* mtDNA (1 747 pz). Co ciekawe, zmienność w obrębie gałęzi Biebrza, jak wykazały analizy sekwencji DNA z żuchw łośi pozyskanych podczas okresu polowań przeprowadzonych w latach 1987 – 1994, czyli ponad 20 lat temu, była jeszcze większa, ponieważ w jej skład wchodził także haplotyp H18 (351 pz), który współcześnie u łośi nie został stwierdzony.

Gałąź Polesie wydaje się być najmniej zmienna spośród trzech grup wyróżnionych w kładzie Centralna Europa, gdyż w jej skład weszły tylko haplotypy H12 i H20, różniące się między sobą w połączonym odcinku mtDNA-cr i cytochromu *b* mtDNA (1 747 pz) zaledwie jedną tranzycją (Rycina 6). Z kolei, gałąź Fennoscandia utworzona jest przez cztery warianty genetyczne, które, co jest dosyć zaskakujące, wyraźnie dzielą się na dwie podgrupy (Rycina 6). Pierwszą z nich tworzą haplotypy H17 i H22, różniące się zaledwie jedną tranzycją w odcinku mtDNA o długości 1 747 pz, natomiast drugą stanowią warianty H6 i H11, między którymi występuje siedem różnic nukleotydowych. Wariant H6, znaleziony przeze mnie u zaledwie jednego osobnika w Puszczy Kampinoskiej, jest jedynym haplotypem zidentyfikowanym w reliktovej populacji łośi w Szwecji

(Hundertmark i wsp. 2002a), natomiast haplotyp H11, osiągający wysoką frekwencję liczebności w populacji kampinoskiej, jest dowodem na spektakularny sukces reprodukcyjny przynajmniej jednej z trzech młodych kłep reintrodukowanych z Białorusi do Puszczy Kampinoskiej w 1951 roku.

Wyliczenia czasu dywergencji netto łośi europejskich sugerują, że klady Centralna Europa i Ural rozdzieliły się około 138 000 lat temu (95% C.I.: 81 208 – 205 400), najprawdopodobniej w końcowej fazie plejstoceńskiego zlodowacenia Riss, trwającego od 300 000 do 130 000 lat temu, względnie na początku interglacjału Riss/Würm, nazywanego również interglacjałem eemskim, który wystąpił 130 000 – 115 000 lat temu. W związku z tym, dywergencja tych dwóch głównych europejskich kładów mtDNA u łośia miała miejsce jeszcze przed ostatnim zlodowaceniem, co pozostaje w pełnej zgodzie z powszechnie znanym fenomenem odkrytym na podstawie analiz mtDNA dla wielu gatunków ssaków występujących w Europie (Taberlet i wsp. 1998; Avise 2009; Hewitt 2011a). Wyodrębnienie się poszczególnych gałęzi/grup w obrębie klady Centralna Europa nastąpiło natomiast w krótkim okresie czasu, przed ostatnim zlodowaceniem. Przedstawione wyliczenia potwierdzają tezę Mikko i Andersson (1995), którzy w oparciu o sekwencje regionu kontrolnego mtDNA u łośi pochodzących ze Szwecji i Ameryki Północnej sugerowali, że czas rozdzielenia się łośi europejskich i północnoamerykańskich mieści się w przedziale od 165 000 do 350 000 lat temu.

Postulowane przeze mnie czasy wyodrębnienia się poszczególnych gałęzi filogenetycznych łośia istotnie jednak wyprzedzają wyliczenia czasu dywergencji dla łośi przyjęte przez Hundertmarka i wsp. (2002a). W oparciu o 2,5% dywergencję netto pomiędzy haplogrupą Europejską i Azjatycką oraz tempo mutacji regionu kontrolnego mtDNA proponowane dla bydła domowego rzędu 31,4%/1mln lat (Bradley i wsp. 1996) i żubra rzędu 39,25%/1mln lat (Burzyńska i wsp. 1999), Hundertmark i wsp. (2002a) sugerują, że obie haplogrupy rozdzieliły się najprawdopodobniej około 38 000 – 30 000 lat temu, natomiast łośie północnoamerykańskie oddzieliły się od azjatyckich blisko 27 000 – 21 500 lat temu. Aby móc ustosunkować się do wyliczeń proponowanych przez Hundertmarka i wsp. (2002a), uwzględniłam w swojej rozprawie również obliczenia czasu dywergencji bazujące na tempie mutacji mtDNA-cr przyjętym dla bydła domowego (Bradley i wsp. 1996). Przeprowadzone obliczenia sugerowałyby, że przed szczytem ostatniego zlodowacenia, LGM, który rozpoczął się blisko 25 000 i zakończył 18 000 lat

temu, wyodrębniły się, w bardzo krótkim okresie czasu, klady Centralna Europa i Ural oraz w obrębie kladu Centralna Europa gałęzie Biebrza, Polesie i Fennoscandia. W efekcie tego, obserwowany poziom zmienności u łośia musiałby powstać relatywnie niedawno, a łoś byłby bardzo młodym gatunkiem, czemu przeczą niektóre dane paleontologiczne (Kostroń 1938).

Wydaje się, że jedynym rozsądnym rozwiązaniem w tej sytuacji jest odniesienie się do założeń zasady „zgodności genealogicznej”, a konkretnie do aspektu III uwzględniającego współdzielenie wzorca przez współwystępujące ze sobą gatunki. Zasięg występowania łośia pokrywa się w znacznym stopniu z zasięgiem innych przedstawicieli jeleniowatych, takich jak sarna europejska i jelen szlachetny. Matosiuk i wsp. (w recenzji) w oparciu o połączone sekwencje regionu kontrolnego i cytochromu *b* mtDNA oraz tempo mutacji dla mtDNA rzędu 4–8%/1mln lat, sugerowane dla jeleniowatych przez Randiego i wsp. (1998), ustalili czas rozdzielenia się linii Wschodniej i Zachodniej sarny europejskiej na około 290 000 – 350 000 lat temu, natomiast linii filogenetycznych sarny syberyjskiej (*Capreolus pygargus*) na blisko 170 000 – 530 000 lat temu. Analizy regionu kontrolnego mtDNA u jelenia szlachetnego wykonane w oparciu o tempo mutacji rzędu 10,3%/1mln lat (Peters i wsp. 2005) wskazują, że występujące w Europie linie Zachodnia i Wschodnia, wyodrębniły się mniej więcej 272 300 lat temu (175 300 – 384 700; Skog i wsp. 2009). Postulowane przeze mnie czasy dywergencji poszczególnych kładów i grup filogenetycznych mtDNA u łośia oraz czasy dywergencji proponowane dla sarny europejskiej i syberyjskiej oraz jelenia szlachetnego wykazują więc wyraźny stopień zgodności filogenetycznej pod względem aspektu III. Pozwala mi to uznać przyjęte przeze mnie wyliczenia dywergencji u łośia za wysoce prawdopodobne, o ile założymy, że te same procesy historyczne są odpowiedzialne za podobnie wyglądające, główne podziały filogenetyczne w obrębie tych czterech gatunków.

Kład Centralna Europa, w obrębie którego wyróżnione zostały gałęzie Biebrza, Polesie i Fennoscandia wydaje się reprezentować jeden z bardziej zmiennych kładów filogenetycznych łośi. Może to sugerować, że efektywna wielkość europejskiej populacji łośi była duża i/lub, że łośie europejskie wywodzą się z kilku różnych, lokalnych refugium glacialnych. Bimodalny obraz rozkładu niedopasowań nukleotydowych dla haplotypów łośi należących do kladu Centralna Europa (Rycina 14) potwierdza, że w Europie występowały co najmniej dwa lokalne refugia glacialne, w których łośie przetrwały szczyt

ostatniego zlodowacenia. Dane paleontologiczne wskazują, że w trakcie LGM okres niekorzystnych zmian klimatycznych i środowiskowych łosie przeżyły praktycznie w tych samych „śródziemnomorskich” refugiach glacialnych, co jelen szlachetny i sarna europejska, mianowicie na Półwyspie Bałkańskim i Apenińskim (Sommer i Nadachowski 2006). Obecność refugium glacialnych zlokalizowanych w tych samych rejonach dla łosia, sarny europejskiej i jelenia szlachetnego potwierdza możliwość wystąpienia podobnej historii ewolucyjnej dla tych gatunków jeleniowatych. Stanowi to ważny argument, dodatkowo potwierdzający słuszność przyjętych przeze mnie wyliczeń czasu dywergencji dla łosi europejskich. Jak argumentują Sommer i Nadachowski (2006), skamieniałości łosi, podobnie jak jelenia szlachetnego, odnalezione zostały również w refugium Karpackim. Wydaje się, że spośród tych trzech europejskich refugium glacialnych zidentyfikowanych dla łosia, udział w postglacialnej rekolonizacji Europy miały jedynie osobniki wywodzące się z refugium Bałkańskiego i Karpackiego. Udział osobników, które LGM przetrwały w refugium Apenińskim, w rekolonizacji polodowcowych obszarów Europy Północnej i Centralnej wydaje się być wysoce wątpliwy, ponieważ współcześnie żyjące łosie, które wywodzą się z tego refugium, reprezentowałyby jedną z najbardziej zróżnicowanych gałęzi na drzewie pokrewieństw filogenetycznych, podobnie jak to jest w przypadku sarny europejskiej. Potomkowie osobników sarny europejskiej, którzy przetrwali okres LGM w refugium Apenińskim, zostali sklasyfikowani jako oddzielny, endemiczny podgatunek sarny *Capreolus capreolus italicus* (Festa 1925). Populacja *C. c. italicus* występująca w centralnej i południowej części Włoch wyróżnia się posiadaniem unikalnych wariantów mtDNA (Randi i wsp. 1998, 2004; Vernesi i wsp. 2002), charakterystycznych wyłącznie dla tej populacji genotypów mikrosatelitarnego DNA (Randi i Mucci 2001; Lorenzini i wsp. 2002) oraz indywidualnych cech morfometrycznych (Montanaro i wsp. 2003). Najprawdopodobniej bariera jaką stanowią Alpy, nie pozwoliła osobnikom sarny europejskiej skolonizować Europy po ustąpieniu ostatniego zlodowacenia (Randi i wsp. 1998). Wydaje się więc logiczne, że również łosie, które LGM przeżyły w refugium Apenińskim, nie były w stanie pokonać Alp i w efekcie wyginęły w średniowieczu (Schmölcke i Zachos 2005). Zatem, w procesie postglacialnej rekolonizacji Europy Centralnej i Północnej uczestniczyły osobniki, które LGM przetrwały w refugium Bałkańskim i Karpackim, jak i te, reprezentujące kład Ural, a które LGM przetrwały w refugium/refugiach zlokalizowanych we wschodniej części europejskiego zasięgu łosia

na południe od Uralu (Panov 1999; Sipko i Kholodova 2009). Należy zwrócić uwagę na istotny fakt, że łośie należące do kladu Ural zasiedlają zdecydowaną większość europejskiego arealu gatunku, mianowicie od Uralu po Polskę i Niemcy. Natomiast kład Centralna Europa ma zdecydowanie bardziej ograniczony zasięg występowania, a w jego obrębie zaznacza się wyraźny podział na łośie „skandynawskie” oraz „biebrzańskie” i „poleskie”. Taki wzorzec filogeograficzny jednoznacznie wskazuje na kolonizację ze wschodu i oznacza, że ekspansja demograficzna i przestrzenna kladu Ural była znacznie większa niż kladu Centralna Europa. Wzorzec ten jest bardzo podobny do obrazu zróżnicowania uzyskanego dla niedźwiedzia brunatnego w Europie (Korsten i wsp. 2009; Davison i wsp. 2011), który reprezentuje główny model postglacjalnej rekolonizacji Eurazji przez różne gatunki ssaków (Taberlet i wsp. 1998; Hewitt 1999; Korsten i wsp. 2009; Davison i wsp. 2011). Wzorzec niedźwiedzia brunatnego został odnaleziony między innymi u nornika burego (*Microtus agrestis*; Jaarola i Searle 2002), polatuchy (*Pteromys volans*; Oshida i wsp. 2005), ryjówki malutkiej i aksamitnej (Bilton i wsp. 1998). Wzór postglacjalnej kolonizacji północnych obszarów Eurazji opisany dla tych gatunków wyróżnia się nagłą ekspansją linii maczynych, odbywającą się na rozległym terytorium Eurazji Północnej z pojedynczego refugium wschodniego przy jednoczesnym braku ważnych barier ograniczających dyspersję (Korsten i wsp. 2009).

Zdecydowana większość obszarów postglacjalnej Europy została więc skolonizowana przez łośie należące do kladu Ural, mniejszy udział wniosły z całą pewnością łośie, które przetrwały w refugium Bałkańskim i Karpackim. Refugium Bałkańskie uważane jest za ważne źródło postglacjalnej rekolonizacji wielu gatunków fauny Europy (Taberlet i wsp. 1998; Hewitt 2004, 2011a, b), podczas gdy wkład osobników gatunków, które przetrwały w refugium Karpackim w procesie rekolonizacji Europy jest wciąż nieokreślony i niedoceniony. Rejon karpacki stanowił bez wątpienia ważne refugium dla wielu europejskich ssaków, między innymi dla rysia (Gugolz i wsp. 2008) oraz jelenia szlachetnego (Sommer i Zachos 2009; Skog i wsp. 2009). To właśnie z refugium Karpackiego wywodzi się, przynajmniej częściowo, reliktowa populacja jelenia szlachetnego występująca na Ukrainie (Tatarinov 1973). Przeżycie w refugium Karpackim mogło dać gatunkom przewagę w pewnych środowiskach nad osobnikami wywodzącymi się z innych linii filogenetycznych. Osobniki łośicy należące do linii, która przetrwała w Karpatach wykazują selektywną przewagę, rozpoznaną jako adaptacja do występowania

w regionach o zimniejszym klimacie, w porównaniu do osobników wywodzących się z innych refugium glacialnych (McDevitt i wsp. 2012). Z drugiej strony, występowanie linii Karpackiej nornicy rudej (*Myodes glareolus*) jest zawężone do obszarów cieplejszych, w porównaniu do linii Wschodniej, której zasięg obejmuje obszary znacznie zimniejsze (Wójcik i wsp. 2010).

Analiza składu fauny i flory oraz zasadniczych tras postglacialnej kolonizacji Skandynawii (Hewitt 2004, 2011a, b) pozwala przypuszczać, że łosie należące do gałęzi Fennoscandia okres LGM mogły przetrwać w refugium Bałkańskim, co jednocześnie sugerowałoby, że rejon karpacki mógł pełnić rolę refugium glacialnego dla łosi z gałęzi Biebrza i Polesie. Jednak bez wykonania analiz genetycznych skamieniałości łosi znalezionych w poszczególnych regionach refugialnych, zagadnienie to pozostaje na dzień dzisiejszy nierozwiązane. Jest to zasadniczy problem pojawiający się w badaniach filogenetycznych u wielu gatunków, których populacje źródłowe wyginęły.

Jednomodalny rozkład niedopasowań nukleotydowych, jaki otrzymałam dla gałęzi Biebrza (Rycina 15), bazując na analizach odcinka mtDNA-cr o długości 607 par zasad i 351 par zasad, jest oczekiwany dla tych populacji, które przeszły przez etap niedawnej ekspansji lub doświadczyły *bottleneck* (Slatkin i Hudson 1991; Rogers i Harpending 1992; Prado i wsp. 2012). Ekspansja demograficzna gałęzi Biebrza (mtDNA-cr o długości 607 pz) miała miejsce najprawdopodobniej 4 413 – 8 826 lat temu (95% C.I.: 491 – 10 296), czy też, jak wskazują analizy odcinka mtDNA-cr o długości 351 par zasad, blisko 7 631 – 15 262 lat temu (95% C.I.: 1 032– 17 806). Procesowi temu sprzyjał z całą pewnością rozwój preferowanej przez łosie bogatej bazy żerowej, w tym zakrzewień łożowych i wierzbowo-brzozowych, które opanowały bagienne obniżenia i doliny rzek po cofnięciu się pokryw lodowych. Wydaje się wysoce prawdopodobne, że czas ekspansji demograficznej przypadł przede wszystkim w najbardziej dla łosia korzystnym okresie klimatycznym, jakim był okres borealny holocenu, trwający około 9 000 – 8 000 lat temu, a który związany był z rozwojem borów sosnowych oraz lasów liściastych na żyznych siedliskach (Raczyński 2006). Wyraźnym sygnałem ekspansji demograficznej grupy Biebrza (mtDNA-cr 607 pz) jest różna od zera wartość parametru Tau (tj. czasu dywergencji w jednostkach mutacyjnych; $\tau = 3,0$; Tabela 30) oraz ujemna i istotna wartość testu *D* Tajima (1989; -1,975; $P < 0,001$). Z kolei, ekspansja przestrzenna gałęzi Biebrza, w porównaniu do ekspansji demograficznej, miała miejsce niedawno. Ekspansja

przestrzenna, jak wynika z analizy odcinka mtDNA-cr o długości 607 par zasad wystąpiła blisko 160 – 320 lat temu (95% C.I.: 91 – 4 601), czy też, jak sugeruje analiza odcinka mtDNA-cr o długości 351 par zasad, około 232 – 463 lat temu (95% C.I.: 160,26 – 4 217,54).

Przedstawione wyliczenia dotyczące czasu ekspansji demograficznej łośi z grupy Biebrza nakładają się w czasie z ekspansją demograficzną linii Centralnej sarny europejskiej w Polsce, mającą miejsce 7 600 – 15 100 lat temu (Matosiuk i wsp. w recenzji) oraz ekspansją jelenia szlachetnego w Szkocji, która zaszła 8 200 lub 16 400 lat temu (2 900 – 32 700; Pérez-Espona i wsp. 2009). Ekspansja zasięgu sarny europejskiej i jelenia szlachetnego w Europie Centralnej rozpoczęła się 14 700 – 11 600 lat temu (Sommer i Zachos 2009), przy czym kolonizacja większości obszarów Europy Centralnej, obejmująca niziny północne, została zainicjowana we wczesnym holocenie, blisko 11 000 lat temu, kiedy panujące temperatury osiągnęły obecnie notowane wartości. Czasy ekspansji przedstawione dla trzech gatunków jeleniowatych pozostają w pełnej zgodzie z założeniami aspektu III „zgodności genealogicznej”, dotyczącego współwystępujących ze sobą gatunków.

Zmienność genetyczna sekwencji mtDNA-cr u łośi w Polsce

Informacje uzyskane z analizy sekwencji tRNA^{pro} i regionu kontrolnego mtDNA u 588 osobników łośi w Polsce pozostają w znacznym kontraście z ogólnie przyjętym założeniem występowania bardzo niskiego poziomu zmienności mtDNA u łośia. W próbie łośi z Polski zidentyfikowałam aż siedem nowych w skali Europy wariantów genetycznych mtDNA, podkreślając rolę Polski, jako bardzo ważnego obszaru zmienności tego gatunku.

Wykres rozkładu liczby niedopasowań nukleotydowych par porównywanych sekwencji mtDNA-cr (607 pz) dla próby z Polski przyjmuje kształt multimodalny, czy też nierówny, „poszarpany” (ang. *ragged*; Rycina 13). Otrzymany obraz jest efektem występowania w Polsce łośi wywodzących się z kilku linii ewolucyjnych, a jak sugeruję na podstawie analiz filogenetycznych, szczyt ostatniego zlodowacenia łośie przetrwały w różnych refugiach glacialnych, w konsekwencji więc polodowcowa rekolonizacja obszaru Polski odbywała się z różnych kierunków. Obecność różnych linii filogenetycznych na danym obszarze, wywodzących się z różnych refugiów, jest głównym

czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost poziomu zmienności genetycznej gatunków (Provan i Bennett 2008). Między występującymi w Polsce liniami ewolucyjnymi łośi, wyróżniającymi się obecnością haplotypów reprezentujących różne linie mtDNA, wytworzyła się wtórna strefa kontaktu. Zlokalizowana jest ona w Polsce północno-wschodniej i przebiega między autochtonicznymi populacjami łośi charakteryzującymi się posiadaniem haplotypów należących do gałęzi Biebrza (haplotypy H1, H10 i H13), Polesie (haplotypy H20 i H22) i częściowo Fennoscandia (haplotypy H17 i H22), a populacjami w których przeważają warianty genetyczne należące do kladu Ural (haplotypy H2, H3 i H4).

Takie wtórne strefy kontaktu w Polsce zostały już wcześniej rozpoznane dla wielu gatunków ssaków, między innymi dla zębiełka (*Crocidura*; Pucek i Raczyński 1983), ryjówki aksamitnej (Wójcik 1993), nornicy rudej (Wójcik i wsp. 2010), czy też łasicy (Lebarbenchon i wsp. 2010; McDevitt i wsp. 2012). Dowodzi to, zgodnie z sugestiami McDevitta i wsp. (2012), że Polska stanowi swoistą *'suture zone'*, charakteryzującą się obecnością wielu wtórnych stref kontaktu wyróżnionych dla gatunków, ras i linii filogenetycznych.

Populacje łośi w Polsce można podzielić na dwa główne klastery (Rycina 2). Pierwszy z nich, tzw. „północny”, tworzą populacje występujące w Polsce północno-wschodniej, gdzie dominującym wariantem mtDNA-cr jest „biebrzański” H1 lub „fiński” H2. Drugi klaster, „południowo-centralny”, grupuje populacje, w których przeważa inny „fiński” wariant genetyczny – H3 oraz haplotyp „kampinoski” H11. Co ciekawe, łośie w Szwecji (Charlier i wsp. 2008), Norwegii (Haanes i wsp. 2011), jak i Finlandii (Kangas i wsp. 2013) wykazują podobny, wyraźny podział na dwa klastery: północny i południowy, między którymi występuje strefa hybrydyzacji. Kangas i wsp. (2013) sugerują, że wzór struktury genetycznej obserwowany w Finlandii ma pochodzenie historyczne. Wskutek intensywnego kłusownictwa w XVIII i XIX wieku łośie w Finlandii przetrwały w dwóch izolowanych, niewielkich populacjach, z których jedna występowała w części północno-wschodniej, a druga w części południowo-wschodniej kraju (Nygrén 2009), dając początek współczesnym populacjom łośi.

Reliktowy charakter populacji łośi w dolinie Biebrzy

Populacje reliktowe uznawane za wyznacznik potencjału ewolucyjnego gatunku, najczęściej wskutek izolacji i małej efektywnej wielkości populacji, charakteryzują się zredukowanym poziomem zmienności (Hofreiter i wsp. 2004). Identyfikacja populacji reliktowych wymaga przeprowadzenia badań uwzględniających zastosowanie różnych markerów genetycznych, podlegających różnym regułom dziedziczenia (Hofreiter i wsp. 2004). W celu wykrycia relikтового charakteru populacji biebrzańskiej łośi w dolinie Biebrzy, określiłam zmienność sekwencji mitochondrialnego DNA (dziedziczony w linii matczynej) i zlokalizowanych na chromosomie Y (dziedziczony w linii ojcowskiej), genu *MHC II DRB* oraz loci mikrosatelitarnego DNA (dziedziczone po obojgu rodzicach) u 588 łośi z Polski, w tym 155 z doliny Biebrzy, 15 osobników z Litwy i 9 z Niemiec.

Sekwencje mtDNA – reliktowy charakter populacji biebrzańskiej

Analiza prób czasowych pochodzących z lat 1987 – 1994 i 2007 – 2011 umożliwiła mi zidentyfikowanie w populacji łośi w dolinie Biebrzy unikalnego haplotypu H1, którego obecność jest najprawdopodobniej wynikiem redukcji liczebności populacji biebrzańskiej i jej długotrwałej izolacji przestrzennej od ciągłego zasięgu gatunku. Haplotyp H1 należący do gałęzi Biebrza w obrębie kladu Centralna Europa, wydaje się być jednym z bardziej zróżnicowanych w stosunku do swoich europejskich odpowiedników, co ilustrują drzewa i sieć filogenetyczna (Ryciny 3 – 7). Jest on śladem pozostawionym przez autochtoniczną populację łośi, która zasiedliła obszar doliny Biebrzy po szczycie ostatniego zlodowacenia.

Zaledwie co piąty łoś w dolinie Biebrzy posiada rodowód wschodni, który ujawnia się posiadaniem jednego z trzech wariantów „fińskich”: H2, H3 lub H4. Co ciekawe, frekwencja haplotypu H1 w dolinie Biebrzy rośnie z północy na południe doliny, zdecydowanie dominując w subpopulacji występującej w basenie dolnym. Całkowicie odwrotna zależność dotyczy z kolei „fińskich” wariantów genetycznych H2 i H4, które występują u 70% łośi z basenu górnego i zaledwie u 2% łośi z basenu dolnego. Osobniki posiadające haplotypy należące dla kladu Ural są więc najprawdopodobniej migrantami z Puszczy Augustowskiej, znajdującej się w bezpośrednim sąsiedztwie basenu górnego

doliny Biebrzy, a w której 94% łośi wyróżnia się obecnością wariantów „fińskich”. Frekwencja poszczególnych haplotypów mtDNA-cr w basenach doliny Biebrzy przekłada się na ograniczony przepływ genów w linii żeńskiej pomiędzy basenami dolnym i górnym ($\Phi_{ST} = 0,59$; $P < 0,05$) oraz środkowym i górnym ($\Phi_{ST} = 0,23$; $P < 0,05$). Co równie zaskakujące, średnie zróżnicowanie genetyczne występuje również pomiędzy subpopulacjami łośi bytującymi w basenie dolnym i środkowym.

Jedną z cech właściwych populacjom reliktowym jest zredukowany poziom zmienności. Populacja łośi w dolinie Biebrzy wyróżnia się obecnością zaledwie czterech haplotypów mtDNA-cr oraz bardzo niską wartością różnorodności haplotypowej i nukleotydowej (Tabela 11). Podobny wzorzec obserwujemy w dwóch pozostałych reliktowych populacjach łośi : w Szwecji (Hundertmark i wsp. 2002a) i na Alasce (Hundertmark i wsp. 2006). W populacji łośi w Szwecji stwierdzono występowanie tylko jednego haplotypu mtDNA-cr: H6, podczas gdy w populacji na Alasce zidentyfikowano dwa haplotypy, różniące się zaledwie jedną substytucją. Niskie wartości różnorodności haplotypowej i nukleotydowej sugerują, że populacje przeszły niedawny *bottleneck*, co potwierdzają dane historyczne (Hundertmark i wsp. 2002a, 2006). Szczyt kulminacyjny procesu redukcji liczebności łośi został osiągnięty w XVIII i XIX wieku, kiedy łośie zostały praktycznie wytępione w Norwegii, Finlandii, Europie Centralnej, a izolowane, niewielkie grupy pozostały jedynie w południowo-zachodniej i północno-wschodniej części Półwyspu Skandynawskiego oraz w kilku miejscach w Europie Centralnej, w tym w lasach wokół Rajgrodu (Brincken 1826; Markgren 1974; Danell i Bergström 2008; Nygrén i wsp. 2008). Okres II wojny światowej przetrwało zaledwie kilkanaście osobników w dolinie Biebrzy, na terenie rezerwatu Czerwone Bagno, których śladem jest obecność haplotypu H1 w populacji biebrzańskiej.

Niezmiernie ciekawa wydaje się również obecność w polskich populacjach łośi osobników posiadających haplotypy mtDNA-cr H10 i H13, które razem z haplotypem H1 tworzą w obrębie kladu Centralna Europa gałąź Biebrza. Mimo że oba te haplotypy nie zostały znalezione w populacji biebrzańskiej, najprawdopodobniej należą do dużej autochtonicznej grupy, która żyła w Polsce w końcu XIX wieku przed wystąpieniem bardzo surowego *bottleneck* (Brincken 1826). Oba haplotypy osiągają obecnie bardzo niskie frekwencje. Współcześnie wariant mtDNA-cr H10 znalazłam u pojedynczych osobników w populacjach MRG, SRO, LCH, ale liczniej reprezentowany jest on

w populacji KWD, gdzie posiada go praktycznie co piąty osobnik (Rycina 2). Nieoczekiwanie haplotyp ten stwierdziłam także w populacji Konarzewo, położonej 40 km na zachód od Kołobrzegu, gdzie okazał się on być jedynym haplotypem w tej populacji. Populacja KON reprezentuje najbardziej na zachód wysuniętą populację łośi w Polsce, charakteryzując się przy tym silnie zredukowanym poziomem zmienności w mtDNA. Najprawdopodobniej haplotyp H10, który jest u łośi bardzo rzadkim wariantem genetycznym, dotarł do populacji KON w efekcie tak zwanego ‘*surfingu*’ genetycznego, który jest spowodowany przez dryf genetyczny połączony z powtarzającymi się efektami założyciela w populacjach zlokalizowanych na obrzeżu ekspansji (Waters i wsp. 2013). Haplotyp H10 „surfował” na fali frontu rozszerzającej się populacji, wskutek czego stał się dominującym w lokalnym terenie. Z kolei haplotyp H13 liczniej, bo w zasadzie u co trzeciego osobnika, występuje w populacji GWL, a dodatkowo zidentyfikowałam go u jednego osobnika w populacji LDZ. Jego powiązanie z haplotypem H1 sugeruje, że mógł on przybyć do Kompleksu Gostynińsko-Włocławskiego z Polski północno-wschodniej. Z drugiej strony, wysoka frekwencja haplotypu H13 w populacji GWL i jednocześnie silnie ograniczone występowanie tego haplotypu może wskazywać, że reprezentuje on autochtoniczną populację, która osiedliła się i przetrwała w regionie Gostynińsko-Włocławskim, co byłoby nowym, do tej pory nieudokumentowanym potwierdzeniem przetrwania łośi w Polsce po II wojnie światowej na innym obszarze niż dolina Biebrzy.

Gałąź Polesie reprezentują haplotypy H12 i H20, które wykryłam w populacjach NPN, SRO i PPN. Analizy sekwencji cytochromu *b* wykazały, że wszystkie osobniki o haplotypach H12 i H20 posiadają jeden wspólny wariant z osobnikami należącymi do gałęzi Biebrza. Haplotypy H12 i H20 są niezmiernie rzadko występującymi wariantami genetycznymi. Warto nadmienić, że haplotyp H12 wystąpił u 4% osobników w populacji NPN, podczas gdy H20 u 2% łośi w populacji PPN. Wydaje się, że osobniki posiadające te warianty genetyczne są potomkami łośi, które mogły okres wojenny przetrwać na Polesiu. O tym, że na Polesiu na początku XX wieku występowały łośie, świadczą informacje, według których restytucję łośia do Puszczy Białowieskiej w 1937 roku przeprowadzono poprzez translokację kilku osobników z Polesia (Samojlik 2005). Spośród nich, okres II wojny światowej przetrwały zaledwie trzy sztuki, ale co ciekawe, sugeruje się, że łośie zasiedliły obszar Puszczy Białowieskiej przychodząc z bagien Polesia, najpierw do części białoruskiej Puszczy, a od 1967 stale zamieszkując również część polską (Samojlik 2005).

Gałąź Fennoscandia reprezentują w Polsce cztery haplotypy: H6, H11, H17 i H22. Haplotyp H6, wcześniej opisany dla reliktywnej populacji łośia w Szwecji (Hundertmark i wsp. 2002a) znalazłam w Polsce tylko u jednego osobnika, pochodzącego z populacji KPN. Zastanawiająca jest bez wątpienia obecność łośia o haplocypie H6 w populacji karpinoskiej. Wprawdzie w 1955 roku do populacji „karpinoskiej” dołączył byk o szwedzkim rodowodzie z hodowli likwidowanej w Białowieży (Dzięciołowski i Pielowski 1993), nie mógł on jednak przekazać go potomstwu, ponieważ mtDNA dziedziczony jest wyłącznie w linii matczynej. Jeśli uwzględnimy jednak fakt, że haplocyp H6 grupuje się na drzewie filogenetycznym z haplocypem H11, to jest prawdopodobne, że jedna z reintrodukowanych w 1951 roku z Białorusi kłep mogła posiadać wariant genetyczny H6, który wskutek dryfu genetycznego został niemal całkowicie wyeliminowany.

Bardzo nielicznie reprezentowane są w Polsce dwa kolejne haplotypy należące do gałęzi Fennoscandia: H17 i H22, znalezione u osobników w populacjach SRO, KWD i LCH, które najprawdopodobniej stanowią pozostałość po kilkunastu łośiach, które przetrwały w XIX wieku na terenie byłych Prus Wschodnich (obecny Obwód Kaliningradzki), a ich potomkowie w 1939 roku dali początek grupie łośi złożonej z blisko 1300 sztuk (Steinbach 2009). Po zakończeniu II wojny światowej i utracie przez Niemcy prowincji wschodnich, łośie zostały tu drastycznie zredukowane, aczkolwiek pewne osobniki najprawdopodobniej skolonizowały Polskę przez przejście granicy polsko-rosyjskiej, o czym świadczy fakt, że w tym okresie kilka łośi zaobserwowano w okolicach Gołdapi (Lenkowa i Panfil 1973).

Ponad połowa zidentyfikowanych u łośi w Polsce haplocypów mtDNA-cr (H6, H10, H12, H13, H17, H20 i H22) jest i jak pokazały analizy materiału muzealnego pochodzącego z lat 1987 – 1994 była reprezentowana przez bardzo niewielką liczbę osobników. Fakt ten powoduje, że ciągłość gałęzi filogenetycznych w obrębie kładu Centralna Europa jest zagrożona i niepewna. Doskonałym przykładem tej sytuacji jest haplocyp H18 należący do gałęzi Biebrza, który został wyeliminowany w przeciągu ostatnich kilkudziesięciu lat.

Sekwencje markerów zlokalizowanych na chromosomie Y – reliktowy charakter populacji biebrzańskiej

Analiza genów zlokalizowanych na chromosomie Y pozwoliła mi stwierdzić, że poziom zmienności nukleotydowej u łośia jest bardzo niski, co pozostaje w zgodzie z ogólnie obserwowanym u ssaków silnie zredukowanym polimorfizmem markerów związanych z chromosomem Y. Fakt, że istnieje szereg problemów z zastosowaniem i identyfikacją markerów chromosomu Y, oraz że u wielu gatunków są one monomorficzne powoduje, że analizy tych genów, chociaż bardzo cenne w biologii i ekologii molekularnej, nie cieszą się szczególną popularnością. Chciałabym podkreślić, że są to pierwsze i jedyne, jak do tej pory badania, dzięki którym oszacowany został poziom zmienności genetycznej u samców łośi.

Analiza siedmiu genów zlokalizowanych na chromosomie Y pozwoliła wykryć polimorfizm tylko w jednym z nich – *DBY14*, pozostałe geny okazały się monomorficzne. Fakt, że u łośi w Polsce znalazłam cztery haplotypy genu *DBY14* wydaje się być nieoczekiwany, szczególnie, gdy odniesiemy to do braku zmienności w genach zlokalizowanych na chromosomie Y u innych ssaków kopytnych. U samców łośi z obszaru doliny Biebrzy, pozyskanych podczas okresu polowań w latach 1987 – 1994, jak również występujących tu współcześnie, znalazłam dwa warianty genetyczne odcinka *DBY14*. Obok haplotypu H1-*DBY14*, który jest najczęściej u łośi stwierdzanym wariantem *DBY14*, zarówno w Polsce, jak i w próbach spoza Polski, zidentyfikowałam również haplotyp H2-*DBY14*, który z podobną frekwencją wystąpił zarówno w populacji z lat 1987 – 1994, jak i w populacji współczesnej. Warto podkreślić, że haplotyp ten, z wyjątkiem populacji reintrodukowanej w Kampinoskim Parku Narodowym, w innych współczesnych populacjach łośi z Polski, z Litwy, u pojedynczych samców z Białorusi, Finlandii, Szwecji i Syberii nie został odnaleziony. Haplotyp H2-*DBY14* jest najprawdopodobniej śladem, jaki pozostawiły po sobie samce wywodzące się z populacji autochtonicznej, która dokonała ekspansji postglacjalnej doliny Biebrzy po ustąpieniu ostatniego zlodowacenia. Obecność haplotypu H2-*DBY14* potwierdza genetyczną unikalność populacji łośi w dolinie Biebrzy, odkrytą wcześniej w oparciu o analizy mtDNA. Z kolei, haplotyp H3-*DBY14*, który znalazłam we współczesnych populacjach PKN i KPN, może wywodzić się od imigrantów z krajów byłego Związku Radzieckiego, którzy po II wojnie światowej

skolonizowali Polskę przez wschodnią granicę naszego kraju. Natomiast wariant genetyczny H4-*DBY14* stwierdzony w populacji KPN wydaje się być pozostałością po udanej reintrodukcji przynajmniej jednego z dwóch samców w 1951 roku z Białorusi. Fakt, że w populacji KPN wystąpiły aż cztery haplotypy *DBY14* potwierdza, że obok reintrodukcji, w powstawaniu tej populacji ważną rolę odegrała imigracja samców z wschodniej granicy Polski, jak również, w mniejszym stopniu, wkład swój wniosły samce z doliny Biebrzy. W całym europejskim obszarze występowania łośia zdecydowanie dominuje haplotyp H1-*DBY14* i poza Polską jest to jedyny haplotyp znaleziony u samców z Litwy, Białorusi, Finlandii, Syberii i Szwecji. W tym kontekście badania polimorfizmu markerów znajdujących się na chromosomie Y u łośia w Polsce przedstawiają się szczególnie interesująco.

Zidentyfikowany u łośia polimorfizm sekwencji genów chromosomu Y z czterema haplotypami *DBY14* jest o tyle nieoczekiwany, że rozmieszczenie poszczególnych wariantów genetycznych nie jest przypadkowe, lecz w logiczny sposób nawiązuje do roli czynników odpowiedzialnych za ukształtowanie struktury genetycznej populacji łośia w Polsce, mianowicie do obecności autochtonicznej populacji w dolinie Biebrzy, migracji łośia ze wschodu do Polski oraz reintrodukcji osobników z Białorusi do Puszczy Kampinoskiej.

Ograniczony poziom polimorfizmu markerów znajdujących się na chromosomie Y jest typowy w populacjach ssaków dziko żyjących, między innymi u wilka (*Canis lupus*) i nornika burego (Hellborg i Ellegren 2004; Hellborg i wsp. 2005), jak również u gatunków udomowionych, takich jak koń (*Equus caballus*; Lindgren i wsp. 2005). Badania poziomu zmienności nukleotydowej u osobników jelenia szlachetnego reprezentujących pięć podgatunków, pochodzących z całego eurazjatyckiego zasięgu gatunku wykazały, że pod względem analizowanych sekwencji wszystkie samce posiadają jeden wariant genetyczny (Barbosa i Carranza 2010). Autorzy (2010) uznali to za nieoczekiwany wynik, zakładając wcześniej, że dyspersja geograficzna i bardzo liczne translokacje, będące cechą charakterystyczną samców tego gatunku, skutkować będą wzrostem polimorfizmu genów znajdujących się na chromosomie Y w obrębie poszczególnych populacji.

O silnie ograniczonym poziomie polimorfizmu sekwencji chromosomu Y wśród ssaków, ze szczególnym uwzględnieniem gatunków jeleniowatych, świadczy fakt, że haplotypy *DBY14* stwierdzone u łośia, na sieci powiązań filogenetycznych grupują się

wyraźnie w jeden kład razem z haplotypem wspólnym dla sarny europejskiej i syberyjskiej (Świsłocka, dane niepubl.), od którego różnią się zaledwie 3 – 5 miejscami polimorficznymi (Rycina 8). Co ciekawe, analizy sekwencji genów zlokalizowanych na chromosomie Y u sarny europejskiej i syberyjskiej pozwoliły w grupie pięciu badanych intronów zidentyfikować tylko dwa (*DBY4* i *DBY8*), w których oba gatunki sarny posiadały inne warianty genetyczne (Świsłocka, dane niepubl.).

Zredukowany poziom zmienności markerów zlokalizowanych na chromosomie Y determinowany jest przez szereg czynników, do których zalicza się dobór naturalny, tempo mutacji, dynamiczną ewolucję chromosomu Y, który z wyjątkiem regionu pseudoautosomalnego (*PAR*) jest jednostką nierekombinującą i mającą swoje homologie w sekwencjach na chromosomie X, system kojarzeń, wzór migracji, czy też efektywną wielkość populacji (Hellborg i Ellegren 2003, 2004). Wydaje się, że w przypadku łośia, jelenia, jak i generalnie u większości ssaków, zredukowany polimorfizm w obrębie sekwencji genów chromosomu Y jest atrybutem właściwego dla tych gatunków systemu kojarzenia, w którym byki są płcią poligamiczną (Greenwood 1980), w efekcie czego, mniejsza liczba samców wnosi swój wkład genetyczny do kolejnych pokoleń, doprowadzając do redukcji efektywnej wielkości populacji w linii ojcowskiej (Caballero 1995).

Sekwencje genu MHC II DRB – reliktowy charakter populacji biebrzańskiej

W niniejszej pracy scharakteryzowałam zmienność fragmentu genu *DRB* drugiego egzonu MHC klasy II, który jest najbardziej zmiennym genem kompleksu MHC II u ludzi, bydła domowego i innych przeżuwaczy (Marsh i Bodmer 1990; Andersson i wsp. 1991) oraz sprawdziłam, czy zróżnicowanie genetyczne między populacjami łośi w obrębie genu *MHC II DRB* może wynikać z działania doboru naturalnego. Przeprowadzone do tej pory badania kompleksu MHC klasy I i II u łośi (Mikko i Andersson 1995; Ellegren i wsp. 1996; Udina i wsp. 2002; Wilson i wsp. 2003) wykazały, że zarówno populacje łośi występujące w Eurazji, jak i Ameryce Północnej charakteryzują się niskim poziomem polimorfizmu, przy jednocześnie wyraźnym zróżnicowaniu między populacjami.

W próbie 212 osobników z Polski i Litwy zidentyfikowałam dziewięć alleli *MHC II DRB*, spośród których siedem było opisanych u łośi w całym zasięgu występowania

gatunku (Mikko i Andersson 1995; Udina i wsp. 2002; Wilson i wsp. 2003). Allele *DRB1*11* i *DRB1*12* stwierdzone przeze mnie odpowiednio w populacjach z doliny Biebrzy i na Litwie, okazały się nowymi dla tego gatunku. W badanej próbie nie znalazłam allelu *DRB1*6* zidentyfikowanego w reliktovej populacji łośia w Szwecji oraz loci *DRB1*7* i *DRB1*10* opisanych dla łośi z Kanady i Dalekiego Wschodu (Mikko i Andersson 1995; Mikko i wsp. 1999; Udina i wsp. 2002; Wilson i wsp. 2003). Najczęstszym allelem u łośi w Polsce okazał się allel *DRB1*1*, który jest także jednym z najczęstszych alleli, posiada go co 4 – 5 osobnik, u łośi w eurazjatyckim zasięgu występowania tego gatunku (Mikko i Andersson 1995; Udina i wsp. 2002). Drugi co do częstości w Polsce allel *DRB1*9* jest z kolei allelem nielicznie występującym w populacjach w Szwecji i na Dalekim Wschodzie, natomiast trzeci allel *DRB1*3* jest bardzo rzadkim allelem w eurazjatyckiej części zasięgu, ale występuje u 20% łośi z Kanady (Wilson i wsp. 2003). Co ciekawe, stwierdzony przeze mnie w Polsce allel *DRB1*5*, w Eurazji znaleziony tylko na Dalekim Wschodzie, jest dominującym allelem w Ameryce Północnej, gdzie posiada go ponad połowa osobników (Mikko i Andersson 1995; Mikko i wsp. 1999; Wilson i wsp. 2003). Różnice we frekwencji alleli genu *MHC II DRB* między populacjami łośi w Polsce nie wynikają z działania doboru pozytywnego, ale mogą podlegać wpływowi doboru równoważącego, który faworyzuje heterozygoty i utrzymuje różnorodność alleli (Rycina 17; $P = 0,06$). Niniejsza analiza przeprowadzona z wykorzystaniem mniejszej liczby loci mikrosatelitarnych wykazała, że sygnał działania doboru równoważącego jest istotny statystycznie ($P = 0,004$; rycina nie została zamieszczona w dysertacji). Co więcej, Mikko i Andersson (1995) stwierdzili przewagę substytucji niesynonimicznych w porównaniu do synonimicznych oraz wykryli sygnał działania doboru naturalnego w locus *MHC II DRB* u łośi. Pozostaje to w zgodzie z wynikami uzyskanymi dla innych jeleniowatych, u których stwierdzono sygnał działania doboru naturalnego (Fernández-de-Mera i wsp. 2009).

W populacji biebrzańskiej zidentyfikowałam największą liczbę alleli genu *MHC II DRB* (Tabela 10). Spośród ośmiu alleli, dwa – *DRB1*4* i *DRB1*11* nigdzie w Polsce poza doliną Biebrzy nie zostały wykryte. Allel *DRB1*11* jest unikalny dla populacji biebrzańskiej. W świetle dotychczasowych analiz genu *MHC II DRB* reliktova populacja w Szwecji posiada unikalny allel *DRB1*6* (Mikko i Andersson 1995), natomiast populacja reliktova w dolinie Biebrzy allel *DRB1*11*. Ciekawy jest również fakt, że allel *DRB1*4*,

który w polskich populacjach łośi wystąpił tylko w dolinie Biebrzy, do tej pory zidentyfikowany był w reliktovej populacji łośi w Szwecji oraz w rosyjskiej części zasięgu łośia (Mikko i Andersson 1995; Udina i wsp. 2002). W reliktovej populacji biebrzańskej aż cztery allele genu *MHC II DRB: DRB1*2, DRB1*4, DRB1*5 i DRB1*11* utrzymywane są z bardzo niską frekwencją, podczas gdy w pozostałych populacjach łośi w Polsce są to allele *DRB1*2, DRB1*5 i DRB1*8* (Tabela 10). Odrębność i unikalność populacji biebrzańskej pod względem sekwencji *MHC II DRB* potwierdziła także analiza PCA (Rycina 12), pokazując, że populacja łośi w dolinie Biebrzy istotnie różni się od pozostałych populacji łośi w Polsce.

Ssaki parzystokopytne charakteryzują się generalnie znaczną zmiennością loci MHC, a najwyższe poziomy polimorfizmu zostały znalezione u kozicy (*Rupicapra rupicapra*), owcy kanadyjskiej (*Ovis canadensis*), jelenia wirginijskiego (*Odocoileus virginianus*) oraz jelenia szlachetnego (De i wsp. 2011). Niskie poziomy zmienności MHC u niektórych gatunków ssaków kopytnych mogą być w dużej mierze efektem plejstocęńskich zlodowaceń (Mikko i wsp. 1999; Loehr i wsp. 2006), gdzie zubożenie puli genowej nastąpiło w efekcie połączonego działania inbrodu i dryfu genetycznego (Mainguy i wsp. 2007). Łosie należą do grupy gatunków, które zamieszkując regiony umiarkowane i borealne, doświadczyły redukcji wielkości populacji oraz związanej z tym późniejszej redukcji zmienności genetycznej podczas plejstocęńskich cykli glacialnych i interglacialnych. Babik i wsp. (2009) dowodzą również, że zredukowana zmienność może być cechą populacyjnego *bottleneck*, przez który przechodziły populacje podczas postglacialnej ekspansji wskutek efektu założyciela.

Według Mikko i Andersson (1995), łośie w trakcie swojej historii ewolucyjnej utraciły zdecydowaną większość zmienności w obrębie MHC, co mogło być spowodowane faworyzowaniem jednego lub też kilku haplotypów MHC albo bardzo drastycznym efektem wąskiego gardła, który poprzedzał rozdzielenie się poszczególnych grup filogenetycznych. Biorąc pod uwagę fakt, że europejskie i północnoamerykańskie łośie dzielą tę samą ograniczoną zmienność MHC, Mikko i Andersson (1995) sugerują, że zdolność populacji łośi do przeżycia, przy jednocześnie niskiej zmienności MHC, musi być utrzymywana w równowadze przez przynajmniej 100 000 lat, pozwalając równocześnie osobnikom na zajęcie okołobiegunowych obszarów półkuli północnej. W tym czasie, między innymi pod wpływem doboru pozytywnego, ukształtowała się po

bottleneck obserwowana dziś zmienność MHC u łośi, charakteryzująca się występowaniem niewielkiej liczby alleli różniących się głównie substytucjami niesynonimicznymi (Mikko i Andersson 1995), a więc utrzymywanymi przez dobór. Autorzy (1995) dowodzą również, że mniejsza liczba alleli *MHC II DRB* u przeżuwaczy, w porównaniu do ssaków naczelnych wynika z faktu, że są one ewolucyjnie młodsze lub że jest to efekt rekombinacji, który może odgrywać istotną rolę u tej grupy zwierząt. Schaschl i wsp. (2006) donoszą, że rekombinacja jest kluczowym mechanizmem molekularnym generującym zmienność genetyczną w loci MHC u ssaków kopytnych, utrzymywaną następnie przez dobór równoważący oraz, że w populacjach, które doświadczyły *bottleneck*, zmienność MHC jest przywracana znacznie szybciej przez mechanizm rekombinacji.

Interesująca w kontekście populacji łośi wydaje się również zależność, zgodnie z którą zmienność MHC wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, w efekcie czego gatunki zamieszkujące obszary znajdujące się w wyższych szerokościach geograficznych mogą zachowywać mniejszą zmienność w obrębie genów MHC (Weber i wsp. 2013). Van Den Bussche i wsp. (1999, 2002) sugerują, że arktyczne gatunki ssaków kopytnych mogą być wystawione na mniejszą liczbę patogenów i pasożytów niż te, które zamieszkują tereny położone blisko równika, w związku z czym powinniśmy się spodziewać mniejszej zmienności MHC w populacjach kopytnych zasiedlających obszary północne, w porównaniu do tych, występujących w niższych szerokościach geograficznych. Badania międzygatunkowe potwierdzają hipotezę Van Den Bussche i wsp. (1999, 2002), że szerokość geograficzna może wpływać na poziom zmienności *MHC DRB* u dzikich kopytnych przez prawdopodobną relację pomiędzy zmiennością MHC i zmiennością patogenów (Mainguy i wsp. 2007). Niska zmienność w locus *DRB* zarówno u łośia, jak i renifera, prawdopodobnie ma również związek z ograniczoną ekspozycją tych gatunków na parazyty występujące w środowisku borealnym (Mikko i Andersson 1995; Ellegren i wsp. 1996; Mainguy i wsp. 2007). Różnorodność ludzkich chorób pasożytniczych i infekcyjnych spada wraz z odległością od równika w kierunków biegunów (Guernier i wsp. 2004), natomiast polimorfizm MHC u ludzi (Prugnolle i wsp. 2005) i dzikich gatunków ryb (Wegner i wsp. 2003; Šimková i wsp. 2006) wzrasta wraz ze wzrostem liczby gatunków patogenów.

Ograniczona zmienność MHC może być również w pewnym stopniu wyjaśniona przez wpływ czynników, które związane są z organizacją socjalną gatunków (Mainguy i wsp. 2007). Wśród tych czynników wymieniany jest samotniczy tryb życia (Ellegren i wsp. 1996), charakterystyczny dla behawioru łosia lub też monogamiczny system kojarzenia (Sommer i wsp. 2002), ograniczające częstość występowania wewnątrzgatunkowych kontaktów, w efekcie czego zredukowana możliwość transmisji chorób infekcyjnych może faworyzować niskie poziomy polimorfizmu MHC.

Należy również mieć na uwadze, że zarządzanie łowieckie zwierzyzną łowną także znacząco wpływa na ekologię i genetykę kręgowców, między innymi poprzez spadek zmienności genetycznej i może prowadzić do krótkoterminowej redukcji komponentów kondycyjnych gatunków (Altizer i wsp. 2003; Fernández-de-Mera i wsp. 2009). W populacji owcy kanadyjskiej, w odpowiedzi na selektywne łowiectwo nastawione na pozyskanie trofeów, zauważono znaczący spadek średnich wartości ciężaru i rozmiarów rogów u samców (Coltman i wsp. 2003). Analizy łosi w Kanadzie wykazały, że relatywnie wyższa zmienność w genie *MHC II DRB* w populacjach z obszarów chronionych, mianowicie parków narodowych, była między innymi konsekwencją braku polowań na tych obszarach (Wilson i wsp. 2003). Co ciekawe, również w trzech polskich populacjach łosi występujących w parkach narodowych stwierdziłam największą liczbę loci *MHC II DRB*. Wilson i wsp. (2003) sugerują, że większe zagęszczenie łosi w parkach narodowych jest z całą pewnością nietypowe w zdecydowanie samotniczej historii życiowej tego gatunku (Ellegren i wsp. 1996), w efekcie czego wzrastająca liczba kontaktów i związany z tym wzrost liczby wymienianych patogenów spowodowała zwiększenie presji działania doboru naturalnego na populacje zamieszkujące obszary objęte ochroną.

Mikrosatelitarny DNA – reliktowy charakter populacji biebrzańskiej

Analizy 11 loci mikrosatelitarnego DNA potwierdziły, że zmienność genetyczna u łosia w Polsce jest wysoka. Pozostaje to w pełnej zgodzie z wysokim poziomem zmienności w mikrosatelitarnym DNA zidentyfikowanym w populacjach łosi w Norwegii (Haanes i wsp. 2011) i Finlandii (Kangas i wsp. 2013). Unikalne allele wykryłam aż w pięciu badanych populacjach, mianowicie w populacji BIE, NPN, KWD, KPN i PPN. Średnia liczba alleli przypadająca na locus (N_A) w całej próbie była bardzo wysoka, przy

czym biebrzańska populacja reliktowa, jak również populacja KPN, która powstała w wyniku efektu założyciela z osobników reintrodukowanych z Białorusi, charakteryzują się obecnością najwyższej w Polsce średniej liczby alleli przypadających na locus (Tabela 22). Najmniejszą wartość N_A zidentyfikowałam w populacjach MSZ, MRG i KWD, w których dominującym wariantem genetycznym jest mtDNA-cr H1, jak również w populacji SRO i LIT (Tabela 22).

Wartość współczynnika wsobności (F_{IS}) w całej próbie była mała i nieistotnie różna od zera, co sugeruje losowy charakter kojarzeń. Jedynie w przypadku populacji BIE, PKN, KPN i PPN wartości F_{IS} istotnie różniły się od zera (Tabela 22). Nie wydaje się jednak, by w populacjach, w których znalazłam największą liczbę alleli (BIE i KPN) zachodziły liczne kojarzenie krewniacze. Wynika to raczej z tak zwanego efektu Wahlunda (1928), który jest częstym powodem deficytu heterozygot w badaniach genetycznych populacji (Nielsen i wsp. 2003). Niedobór heterozygot wynika tu z faktu, że pobierając próby z dwóch izolowanych populacji różniących się między sobą częstościami alleli i pozostających w równowadze Hardy'ego-Weinberga, obie te populacje traktujemy jako jedną całość (Excoffier 2001). Sytuacja ta często ma miejsce, gdy w badanej populacji występuje znaczący odsetek imigrantów o odrębnych genotypach. W przypadku łośi bytujących w dolinie Biebrzy, istotna wartość F_{IS} , która oznacza niedobory heterozygot, została zidentyfikowana jedynie w subpopulacji w górnym basenie, co może oznaczać napływ osobników z sąsiadującej populacji występującej w Puszczy Augustowskiej. Z kolei, subpopulacje żyjące w basenie środkowym, jak i dolnym wykazują cechy populacji panmiktycznych, bez oznak *inbredu*. Współczynnik pokrewieństwa (r), który przyjął wartość ujemną i bliską zera (-0,003) potwierdza, że uwzględnione przeze mnie w badaniach osobniki nie są blisko ze sobą spokrewnione i w konsekwencji nie są wsobne.

Spośród osobników spokrewnionych, najczęściej identyfikowani byli kuzyni, którzy w badanej próbie stanowili 4,95% (Tabela 23). Co ciekawe, najrzadziej stwierdzone były osobniki pozostające ze sobą w relacjach rodzic – potomek. W populacjach BIE, PKN, KPN i PPN, które potencjalnie miałyby wykazywać cechy *inbredu*, wartości współczynnika pokrewieństwa osiągają wartości ujemne i statystycznie różnią się od zera. W poszczególnych populacjach łośi osobniki niespokrewnione reprezentowały zdecydowaną grupę dominującą, której udział wahał się od 78,10% (pop. KWD) do 94,93% (pop. BIE). Warto jednak zauważyć, że w populacji biebrzańskiej trend ten

odpowiada sytuacji obserwowanej jedynie w subpopulacjach występujących w basenie środkowym i dolnym, podczas gdy w subpopulacji w basenie górnym udział osobników niespokrewnionych był najmniejszy (72%). Z kolei, w subpopulacji tej uwidocznił się największy wkład par spokrewnionych, które łącznie stanowiły 28%. Niezwykle ciekawie przedstawia się na tle pozostałych populacji grupa łośi z KWD, w której udział wszystkich par spokrewnionych wyniósł aż 21,9%.

Klasyfikacja rodzaju reliktu i identyfikacja jednostki zarządzania MU

Populacja biebrzańska jest populacją reliktową reprezentowaną przez potomków osobników, którym udało się przetrwać niekorzystne okresy klimatyczne plejstocenu oraz działalność człowieka. Utworzona jest przez osobniki wyraźnie wyróżniające się od pozostałych populacji gatunku posiadaniem unikalnych wariantów genetycznych zidentyfikowanych w różnych markerach molekularnych, podlegających swoistym regułom dziedziczenia: mtDNA, gen *DBY14* zlokalizowany na chromosomie Y, gen *MHC II DRB* i loci mikrosatelitarnego DNA. Ponadto, populacja ta w skali Europy charakteryzuje się małą liczebnością i silnie ograniczonym geograficznym zasięgiem występowania. Populacja biebrzańska położona jest na skraju zasięgu i w efekcie pozostaje wciąż w pewnym stopniu w izolacji geograficznej od reszty zasięgu gatunku.

Zgodnie z klasyfikacją reliktyw przyjętą przez Lomolino i wsp. (2006) populacja biebrzańska należy do reliktyw biogeograficznych, nazywanych reliktywami właściwymi, reprezentującymi takson występujący w danym regionie, znajdujący się w izolacji od swojego głównego centrum rozmieszczenia, a którego obecne występowanie tłumaczy się pozostawieniem jego lub jego przodka w odmiennych warunkach naturalnych, niż istniejące dziś. Z drugiej strony, zgodnie z podejściem Zimmermanna i wsp. (2010), populacja biebrzańska może należeć do reliktyw genetycznych, sklasyfikowanych jako plejstocenijskie populacje reliktywowe, które stwierdzane są zazwyczaj na południowym lub wschodnim, a niekiedy, jak to ma miejsce w przypadku populacji *C. c. italicus* (Randi i wsp. 1998, 2004; Vernesi i wsp. 2002), czy też niedźwiedzia brunatnego (Taberlet i wsp. 1998; Zachos i wsp. 2008; Davison i wsp. 2011; Keis i wsp. 2013), także zachodnim krańcu zasięgu gatunku w Europie i posiadają wyjątkowe, wyraźnie odrębne haplotypy lub też grupy haplotypów. Ważnym kryterium przy ich wyznaczeniu jest również redukcja

zasięgu występowania. Relikty takie zazwyczaj charakteryzują się długą historią ewolucyjną w jednym szczególnym regionie i nie były zdolne do rozszerzania swojego postglacjalnego zasięgu.

Reliktowa populacja łośi w dolinie Biebrzy powinna zostać wyróżniona jako specjalna jednostka zarządzania (MU; Crandall i wsp. 2000). Dane ekologiczne i genetyczne potwierdzają, że zachowuje ona swoją odrębność genetyczną i jest demograficznie niezależna od innych populacji. Populacje, które charakteryzują się autonomią demograficzną powinny być traktowane jako osobne MU, podlegające specjalnym zasadom ochrony i zarządzania (Avisé 2008). Populacja reliktowa łośi w dolinie Biebrzy jest bez wątpienia ważnym komponentem wewnątrzgatunkowej różnorodności genetycznej oraz istotnym wyznacznikiem potencjału ewolucyjnego gatunku, a ochrona takich grup jest jednym z głównych celów Konwencji Berneńskiej.

Źródła i kierunki powojennej ekspansji łośi w Polsce

Ogólny obraz uwzględniający wszystkie analizowane populacje łośi z Polski potwierdza hipotezę Raczyńskiego (2006), że imigracja osobników tego gatunku do Polski z terytorium Białorusi, Litwy, Obwodu Kaliningradzkiego oraz Ukrainy była bardzo ważnym czynnikiem, ponieważ potencjał rodzimej populacji biebrzańskiej nie mógł zapewnić takiego wzrostu pogłowia, jakie dokonywało się w tym regionie. Obecnie aż 44% łośi w Polsce, czyli praktycznie co drugi łoś, posiada jeden z trzech wariantów „fińskich” należących do kladu Ural: H2, H3 i H4, spośród których haplotyp H2 jest najczęstszy, osiągając najwyższe frekwencje w Polsce, na Litwie, w Niemczech oraz, jak wynika z informacji ustnej przekazanej przez dr M. Niedziałkowską, również na Białorusi. Trzy „uralskie” warianty genetyczne zostały ponadto zidentyfikowane, jako jedyne haplotypy u łośi w Finlandii (Hundertmark i wsp. 2002a). Haplotyp H2 wystąpił u 27% zanalizowanych łośi w Polsce, przy czym jeśli w obliczeniach nie uwzględnimy populacji biebrzańskiej, która z uwagi na fakt, że stanowiła główny cel badań przedstawionych w niniejszej rozprawie wyróżnia się zdecydowaną nadreprezentatywnością prób, to udział osobników posiadających wariant H2 wzrasta do 30%.

Obok wariantów „fińskich”, jednym z najczęściej występujących haplotypów u łośi w Polsce jest wariant H1, wywodzący się z populacji biebrzańskiej. Występuje on u 36%

łośi zanalizowanych w Polsce, a co ciekawe, jeśli nie uwzględnimy populacji biebzańskiej, okazuje się, że jego udział na pozostałym obszarze Polski wynosi aż 22%. To podejście pokazuje, iż w powojennej kolonizacji obszarów Polski położonych poza doliną Biebrzy, populacja biebzańska odegrała bardzo znaczącą rolę. Obecnie co 4 – 5 łoś w Polsce wywodzi się z autochtonicznej populacji biebzańskiej, która po zakończeniu II wojny światowej liczyła zaledwie kilkanaście osobników (Lenkowa i Panfil 1973). Wydaje się, że łośie biebzańskie wykazywały silnie ograniczoną dyspersję na tereny znajdujące się na wschód od Polski, ponieważ haplotyp H1 znalazłam tylko u jednego łośia z Litwy, a jak wynika również z informacji ustnej przekazanej przez dr M. Niedziałkowską, spośród 42 osobników zanalizowanych na Białorusi, wariant H1 został znaleziony również tylko w jednym przypadku. łośie z doliny Biebrzy kolonizowały przede wszystkim obszary położone na zachód od doliny Biebrzy, nie dotarły jednak do doliny Noteci, w której 95% osobników posiada warianty „fińskie”, czy też do Niemiec, gdzie u wszystkich łośi stwierdziłam haplotyp „fiński” H2 (Rycina 2).

Przedstawione dane pozwalają stwierdzić, że łośie z autochtonicznej populacji biebzańskiej i łośie z kladu Ural odegrały decydującą rolę w procesie rekolonizacji Polski, jaki rozpoczął się po II wojnie światowej. Potwierdzają to jednoznacznie analizy, które wykonałam na materiale pochodzącym od osobników pozyskanych łowiecko w latach 1987 – 1994. Co 2 – 3 łoś z tamtego okresu posiadał albo wariant mtDNA-cr H1 albo jeden z trzech haplotypów „fińskich”. Osobniki o „uralskich” haplotypach imigrowały do Polski ze wschodu, wykorzystując Północny korytarz ekologiczny (Jędrzejewski i wsp. 2006), dzięki któremu dotarły do populacji PAU, PKN, MRG, SRO, MLN, a nawet do doliny Noteci oraz korytarz Wschodni i Południowo-Centralny, w efekcie czego osiedliły się w populacjach na południu Polski, między innymi w PPN, GRJ, OPC, SWR, STA, DRT i JAR. Z kolei łośie z populacji biebzańskiej, która od drugiej połowy XX wieku rozwijała się bardzo dynamicznie, między innymi dzięki wprowadzaniom sukcesywnie od 1952 roku różnym formom ochrony, zajmowały tereny położone przede wszystkim w południowej części obecnych województw warmińsko-mazurskiego i pomorskiego, wykorzystując południową część korytarza ekologicznego Północnego oraz korytarz Północno-Centralny (Jędrzejewski i wsp. 2006). W efekcie tych procesów założone zostały współczesne populacje MSZ, KWD i LDZ, w których z najwyższą frekwencją liczebności występują osobniki posiadające haplotyp H1. Jak widać, nieliczne populacje, takie jak

NPN, mają pochodzenie mieszane, gdzie udział osobników pochodzących z obu tych źródeł wydaje się być praktycznie wyrównany.

Analiza występowania haplotypu „biebrzańskiego” H1 i „fińskich” wariantów genetycznych w polskich populacjach łośi pozwala wnioskować, że zasadniczy kierunek migracji łośi prowadzi ze wschodu na zachód. Silnym poparciem dla istnienia tego trendu jest analiza migrantów pierwszego pokolenia w loci mikrosatelitarnego DNA, która potwierdziła, że aż 62,5% migrantów przemieszczało się ze wschodu na zachód Polski. Trend ten jest w pełni zgodny z wzorem migracji obserwowanym współcześnie także u łośi w Skandynawii (Kangas i wsp. 2013).

Obok autochtonicznej populacji łośi w dolinie Biebrzy i osobników o wariantach „fińskich” migrujących do Polski ze wschodu, które odegrały zasadniczą rolę w odtworzeniu krajowej populacji tego gatunku, należy jeszcze podkreślić znaczenie reintrodukowanej populacji w Kampinoskim Parku Narodowym. Udział osobników kampinoskich, wyróżniających się posiadaniem haplotypu mtDNA-cr H11 na poziomie 13% ogółu zanalizowanych łośi, nie wydaje się być mały, jeśli dodatkowo uwzględnimy fakt, że populacja ta powstała w wyniku efektu założyciela z zaledwie trzech młodych kłep i dwóch byków przywiezionych z Białorusi w 1951 roku. Wariant genetyczny H11 stał się dominującym haplotypem w populacji KPN, gdzie posiada go aż 72%, co świadczy o bardzo dużym sukcesie reprodukcyjnym przynajmniej jednej z trzech kłep reintrodukowanych do Polski. Co ciekawe, haplotyp H11 w populacji na Białorusi jest niezmiernie rzadko stwierdzany, ponieważ, jak wynika z informacji ustnej przekazanej przez dr M. Niedziałkowska, wśród 42 osobników został znaleziony zaledwie u jednego. Położenie populacji kampinoskiej na lewym brzegu Wisły, w bliskim sąsiedztwie korytarzy migracji wykorzystywanych przez jeleniowate sprawiło, że populacji tej przypisywano główną rolę w rekolonizacji Polski Zachodniej po II wojnie światowej (Raczyński 2006). Jak pokazały przeprowadzone analizy, wyraźny udział osobników z wariantem H11 stwierdziłam tylko w populacjach GWŁ i RDZ, bezpośrednio sąsiadujących z populacją kampinoską, a w których odpowiednio co 5 i co 2 – 3 osobnik posiada wariant mtDNA-cr H11. Pojedyncze osobniki o tym haplocie zostały znalezione jedynie w populacjach MRG, LDZ, CCH i MPN. Wydaje się, że usytuowanie kompleksu Puszczy Kampinoskiej w Polsce Centralnej, blisko aglomeracji warszawskiej i intensywnie rozwiniętej infrastruktury drogowej jest główną przyczyną, która może

ograniczać migrację łośi z Puszczy Kampinoskiej. Fakt, że haplotyp H11 nie występuje w populacjach zlokalizowanych przy wschodniej granicy Polski i praktycznie nie ma go na Białorusi, jest silnym dowodem na pochodzenie tego haplotypu w Polsce wyłącznie od kłepy/kłęp reintrodukowanych w 1951 roku.

Zróżnicowanie genetyczne między populacjami łośi w Polsce

Zróżnicowanie genetyczne – mtDNA-cr

W Polsce, która stanowi najdalej na zachód wysunięty naturalny kraniec europejskiego zasięgu łośia, występuje bardzo wysoki poziom zróżnicowania genetycznego pomiędzy poszczególnymi populacjami tego gatunku w mtDNA, o czym świadczy średnia wartość Φ_{ST} równa 0,25 ($P < 0,001$). Bardzo wysoka, aczkolwiek niespodziewana, wartość Φ_{ST} (0,674) została już wcześniej stwierdzona między populacjami łośi z doliny Biebrzy i Puszczy Augustowskiej sugerując, że nawet jeśli populacje dzieli niewielki, rzędu kilkunastu kilometrów, dystans geograficzny, mogą pozostawać one w znacznej izolacji (Świsłocka i wsp. 2009, 2013b). Ten silnie ograniczony przepływ genów zidentyfikowałam przede wszystkim w Polsce północno-wschodniej. Reliktowa populacja biebrzańska wydaje się pozostawać w izolacji praktycznie w stosunku do wszystkich analizowanych populacji, z wyjątkiem populacji MSZ, KWD i LDZ, w których udział osobników o haplociepie mtDNA-cr H1, a więc o pochodzeniu „biebrzańskim”, jest dominujący. Podobny schemat został również zaobserwowany na Alasce, gdzie reliktowa populacja łośia wyróżnia się silnie ograniczonym przepływem genów w linii żeńskiej do populacji sąsiadujących (Hundertmark i wsp. 2006). Z kolei, populacje zlokalizowane wzdłuż wschodniej granicy Polski (PAU, PKN, PPN) wymieniają swobodnie geny mtDNA z populacją litewską i częściowo między sobą. Co ciekawe, mimo iż populacje z Polski Centralnej GWL i RDZ są do siebie podobne pod względem mtDNA, to przepływ genów między nimi, a populacją kampinoską jest albo istotnie ograniczony, albo praktycznie nie zachodzi.

Analizy grupowania populacji wskazują na istnienie przestrzennego wzoru rozkładu zróżnicowania genetycznego pomiędzy badanymi populacjami łośi w mtDNA. Największy poziom zróżnicowania genetycznego pomiędzy populacjami występuje

w Polsce północno-wschodniej. W pobliżu reliktywnej, autochtonicznej populacji biebrzańskiej grupują się populacje „mazurskie” o wschodnim rodowodzie, natomiast populacje z Polski Wschodniej wykazują łączność z populacją litewską i zapewne również ukraińską i białoruską. Potwierdzona została również odrębność populacji SRO, będąca najprawdopodobniej efektem udziału w powstaniu tej populacji imigrantów ze Wschodu i z byłych Prus Wschodnich oraz odmienność populacji KPN, która jest skutkiem wspomnianego wcześniej efektu założyciela. Przedstawiony obraz jest w pełni zgodny z wzorem kolonizacji Polski przez łosie po II wojnie światowej (Gębczyńska i Raczyński 2004). Co ciekawe, wyraźne w skali Polski zróżnicowanie genetyczne zidentyfikowane między populacjami łosi w Polsce północno-wschodniej zostało również odnalezione u innych gatunków ssaków, między innymi u jelenia szlachetnego (Niedziałkowska i wsp. 2011) i rysia (Ratkiewicz i wsp. 2012). Wbrew oczekiwaniom, że populacja jelenia szlachetnego w Polsce północno-wschodniej jest panmiktyczna, przepływ genów mtDNA jest istotnie ograniczony pomiędzy pewnymi kompleksami leśnymi (Niedziałkowska i wsp. 2011).

Wydaje się, że istnieje kilka możliwych wyjaśnień występowania wysokiego i istotnego zróżnicowania między populacjami łosi w mtDNA. Po pierwsze, populacje te doświadczyły efektów wąskiego gardła w czasach historycznych zarówno w Polsce (Brincken 1826), jak i w dawnych Prusach Wschodnich (Steinbach 2009), co doprowadziło do istotnego zróżnicowania we frekwencji haplotypów pomiędzy nimi. Po drugie, przepływ genów pomiędzy populacjami łosi może być znacznie ograniczony w związku ze wzorcem dyspersji obserwowanym u łosi (Charlier i wsp. 2008). Badania telemetryczne wskazują bowiem, że zarówno samice jak i samce są filopatryczne (Cederlund i Sand 1994). Wysokie i istotne wartości Φ_{ST} i F_{ST} dla mitochondrialnego DNA pomiędzy populacjami łosia, jak i wyliczenia parametrów migracji, M (Tabela 28) zdają się potwierdzać występowanie ograniczonej dyspersji kłep, przynajmniej dla większości populacji. Po trzecie, Hallatschek i wsp. (2007) dokumentują, że ekspansja przestrzenna dokonująca się w dwóch wymiarach, doprowadza do wzrostu zróżnicowania genetycznego pomiędzy populacjami. Schemat kolonizacji Polski obejmujący dyspersję osobników zza wschodniej granicy kraju, zakończoną sukcesem reintrodukcją łosi do Puszczy Kampinoskiej oraz obecność autochtonicznej populacji biebrzańskiej, jak również potomków dużej populacji z Prus Wschodnich oraz z Polesia, mógł uwidocznić się

w strukturze przestrzennej i zdecydowanym gradiencie frekwencji haplotypów mtDNA po ekspansji zasięgu, mającej miejsce po II wojnie światowej. Stanowi to istotne uzupełnienie wiedzy o czynnikach kształtujących strukturę genetyczną populacji łośi, które niedawno, bo w okresie ostatnich kilku powojennych dekad, skolonizowały nowe obszary.

Zróżnicowanie genetyczne – loci mikrosatelitarnego DNA

Niskie zróżnicowanie genetyczne właściwe dla zdecydowanej większości populacji łośi wskazuje, że poziom przepływu genów między populacjami dla osobników obu płci jest tylko nieznacznie ograniczony, o czym świadczą dodatkowo wartości Nm i M (Tabela 28). Co jednak ciekawe, mimo iż między populacją reliktową łośi w dolinie Biebrzy, a pozostałymi populacjami, zróżnicowanie genetyczne (F_{ST}) jest małe, to w zdecydowanej większości otrzymane wartości F_{ST} istotnie różnią się od zera. Analizy pozwoliły stwierdzić, że populacja łośi w PPN jest bardzo zróżnicowana w stosunku do populacji litewskiej, mimo iż dane uzyskane z analiz mtDNA sugerowały, że obie populacje, w których wyraźnie dominują „uralskie” haplotypy mtDNA-cr są do siebie bardzo podobne. Dowodzi to, że imigranci, którzy dotarli na Polesie ze wschodu nie wywodzą się z populacji litewskiej, tylko z innej populacji wschodniej, najprawdopodobniej z Białorusi i/lub Ukrainy.

Dystans genetyczny między populacjami łośi uzyskany dla loci mikrosatelitarnego DNA, dziedziczonych po obojgu rodzicach, był zdecydowanie mniejszy niż sugerowany w oparciu o mitochondrialny DNA, dziedziczony wyłącznie w linii matczynej. Podobny obraz został zaobserwowany między innymi dla populacji jelenia szlachetnego. Mimo iż analizy mtDNA wyraźnie sugerowały, że populacja jelenia szlachetnego w Polsce północno-wschodniej nie jest panmiktyczna (Niedziałkowska 2008) i że przepływ genów jest istotnie ograniczony pomiędzy pewnymi kompleksami leśnymi, to analizy loci mikrosatelitarnych wskazały, iż między populacjami z tej części Polski oraz Białorusi Zachodniej wymiana genów zachodzi na wysokim poziomie (Niedziałkowska i wsp. 2012). Podobna zależność została zaobserwowana w populacjach jelenia szlachetnego w Niemczech i Norwegii, gdzie wyraźną strukturę genetyczną populacji uzyskano w oparciu o mtDNA, podczas gdy dane z loci mikrosatelitarnego DNA nie dostarczały ku temu podstaw (Skog i wsp. 2009).

Podsumowanie

Obserwowany współcześnie wzór zmienności genetycznej populacji łośi w Polsce został ukształtowany zarówno przez procesy naturalne, jak i antropogeniczne. Zasadniczy wpływ miała obecność różnych refugium glacialnych, w których łośie przetrwały szczyt ostatniego zlodowacenia. Przodkowie łośi posiadających współcześnie haplotypy „uralskie” przetrwały w refugium/refugiach wschodnich, podczas gdy łośie z kładu Centralna Europa przeżyły najprawdopodobniej w minimum dwóch lokalnych refugiach glacialnych, co potwierdza bimodalny obraz rozkładu niedopasowań nukleotydowych (Rycina 14). Być może łośie z gałęzi Biebrza i Polesie przetrwały w refugium Karpackim, podczas gdy łośie z gałęzi Fennoscandia przeżyły w refugium Bałkańskim. łośie z gałęzi Fennoscandia charakteryzują się podziałem na dwie podgrupy haplotypów (H6 i H11 oraz H17 i H22), które różnicowały się pod wpływem bariery jaką stanowi Morze Bałtyckie, utrzymujące je w izolacji.

Ważną rolę odegrała również obecność autochtonicznych, lokalnych populacji łośi w Polsce. Jedną z nich jest populacja biebrzańska należąca do gałęzi filogenetycznej Biebrza, która różnicowała się od pozostałych łośi europejskich przed LGM. Obok tej autochtonicznej populacji należy wymienić także populację Srokowo, gdzie najprawdopodobniej żyją potomkowie łośi, którzy przetrwali okres wojenny na terenie byłych Prus Wschodnich (haplotypy H17 i H22) oraz populację GWL (haplotyp H13) i Polesie, gdzie występują łośie posiadające wariant H20. Między tymi populacjami, a populacjami, w których przeważają warianty genetyczne należące do kładu Ural wytworzyła się wtórna strefa kontaktu zlokalizowana w Polsce północno-wschodniej. Kierunek kolonizacji i ekspansja przestrzenna ze wschodu na zachód połączona z kolonizacją Polski przez osobniki z różnych źródeł refugialnych i populacji reliktowych stanowi kolejny ważny czynnik odpowiedzialny za obserwowany wzór zmienności u łośia. Obok tych procesów istotną rolę odgrywa również dryf genetyczny, który w niektórych populacjach doprowadził do spadku zmienności genetycznej oraz być może dobór naturalny, wykazujący znamiona doboru równoważącego, niwelującego różnice między populacjami w loci MHC i doprowadzając do utrzymywania się dużej liczby alleli o wyrównanych frekwencjach. Nie należy zapominać także o udziale czynnika ludzkiego. Reintrodukcje i translokacje łośi spoza Polski skutkują dziś obecnością w Polsce haplotypu

H6, a więc wariantu typowego dla łośi szwedzkich oraz haplotypu H11, będącego śladem po udanej reintrodukcji łośi z Białorusi w 1951 roku.

LITERATURA

- Aguilar A., Garza J.C. (2006). A comparison of variability and population structure for major histocompatibility complex and microsatellite loci in California coastal steelhead (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Molecular Ecology*, 15: 923–937.
- Aguilar A., Roemer G., Debenham S., Binns M., Garcelon D., Wayne R.K. (2004). High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101: 3490–3494.
- Alcaide M., Edwards S.V., Negro J.J. (2007). Characterization, polymorphism, and evolution of MHC class II genes in birds of prey. *Journal of Molecular Evolution*, 65: 541–554.
- Alexandri P., Triantafyllidis A., Papakostas S., Chatzinikos E., Platis P., Papageorgiou N., Larson G., Abatzopoulos T.J., Triantaphyllidis C. (2012). The Balkans and the colonization of Europe: the post-glacial range expansion of the wild boar, *Sus scrofa*. *Journal of Biogeography*, 39: 713–723.
- Altizer S., Harvell D., Friedle E. (2003). Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 18: 589–596.
- Andersson L., Sigurdardóttir S., Borsch C., Gustafsson K. (1991). Evolution of MHC polymorphism: Extensive sharing of polymorphic sequence motifs between human and bovine *DRB* alleles. *Immunogenetics*, 33: 188–193.
- Antao T., Lopes A., Lopes R.J., Beja-Pereira A., Luikart G. (2008). LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a F_{ST} -outlier method. *BMC Bioinformatics*, 9: 323.
- Avise J.C. (1995). Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology*, 9: 686–690.
- Avise J.C. (2000). *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge.
- Avise J.C. (2008). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Second Edition, Sinauer Associates, Sunderland.
- Avise J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.
- Avise J.C., Ball Jr. R.M. (1990). Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7: 45–67.
- Avise J.C., Walker D.E. (1999). Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 96: 992–995.
- Babik W., Branicki W., Sandera M., Litvinchuk S., Borkin L.J., Irwin J.T., Rafiński J. (2004). Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology*, 13: 1469–1480.
- Babik W., Durka W., Radwan J. (2005). Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Molecular Ecology*, 14: 4249–4257.
- Babik W., Pabijan M., Arntzen J.W., Cogălniceanu D., Durka W., Radwan J. (2009). Long-term survival of a urodele amphibian despite depleted major histocompatibility complex variation. *Molecular Ecology*, 18: 769–781

- Babik W., Pabijan M., Radwan J. (2008). Contrasting patterns of variation in MHC loci in the Alpine newt. *Molecular Ecology*, 17: 2339–2355.
- Balloux F., Lugon-Moulin N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155–165.
- Barbosa A.M., Carranza J. (2010). Lack of geographic variation in Y-chromosomal introns of red deer (*Cervus elaphus*). *Journal of Negative Results – Ecology & Evolutionary Biology*, 7: 1–4.
- Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M., Shalom A., Kirkpatrick B.W., Ryan A.M., Clayton D., Li L., Neibergs H.L., Zhang N., Grosse W.M., Weiss J., Creighton P., McCarthy F., Ron M., Teale A.J., Fries R., McGraw R.A., Moore S.S., Georges M., Soller M., Womack J.E., Hetzel D.J.S. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*, 6: 227.
- Beaumont M.A., Nichols R.A. (1996). Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society London B*, 263: 1619–1626.
- Beierkuhnlein C. (2007). Biogeographie - Die räumliche Organisation des Lebens in einer sich verändernden Welt. *UTB Ulmer*, pp. 397.
- Bilton D.T., Mirol P.M., Mascheretti S., Fredga K., Zima J., Searle J.B. (1998). Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265: 1219–1226.
- Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L.F., Hawkins G.A., Solinas-Toldo S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J., Beattie C.W. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136: 619–639.
- Boeskorov G.G. (1996). Karyotype of moose (*Alces alces* L.) from north-eastern Asia. *Proceedings of the Russian Academy of Science*, 329: 506–508.
- Bohonak A.J. (2002). IBD (Isolation By Distance) a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93: 153–154.
- Boursot P., Auffray J.C., Britton-Davidian J., Bonhomme F. (1993). The evolution of the House Mice. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 119–152.
- Bowen L., Aldridge B.M., Gulland F., Van Bonn W., DeLong R., Melin S., Lowenstine L.J., Stott J.L., Johnson M.L. (2004). Class II multiformity generated by variable MHC-DRB region configurations in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics*, 56: 12–27.
- Bowen L., Aldridge B.M., Gulland F., Woo J., Van Bonn W., DeLong R., Stott J.L., Johnson M.L. (2002). Molecular characterization of expressed *DQA* and *DQB* genes in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics*, 54: 332–347.
- Bowyer R.T., Leslie Jr. D.M., Rachlow J.L. (2000). Dall's and Stone's sheep. pp. 491–516. [W]: Demarais S., Krausman P.R. (ed.). *Ecology and Management of Large Mammals in North America*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Bradley D.G., MacHugh D.E., Cunningham P., Loftus R.T. (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 93: 5131–5135.
- Breda M., Marchetti M. (2005). Systematical and biochronological review of Plio-Pleistocene Alceini (Cervidae; Mammalia) from Eurasia. *Quaternary Science Reviews*, 24: 775–805.
- Brincken J. (1826). Memoire descriptif sur la foret imperiale de Białowieża en Lithuanie. N. Glückserg, Warszawa.

- Brown W.M., George Jr. M., Wilson A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 76: 1967–1971.
- Brunhoff C., Yoccoz N.G., Ims R.A., Jaarola M. (2006). Glacial survival or late glacial colonization? Phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*) in north-west Norway. *Journal of Biogeography*, 33: 2136–2144.
- Buchanan F.C., Crawford A.M. (1992). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF70 locus. *Animal Genetics*, 23: 185.
- Buchanan F.C., Crawford A.M. (1993). Ovine microsatellite at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 and OarFCB304 loci. *Animal Genetics*, 23: 145.
- Buchanan F.C., Galloway S.M., Crawford A.M. (1994). Ovine microsatellites at the OarFCB5, OarFCB19, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB129 and OarFCB226 loci. *Animal Genetics*, 25: 60.
- Burzyńska B., Olech W., Topczewski J. (1999). Phylogeny and genetic variation of the European bison *Bison bonasus* based on mitochondrial DNA D-loop sequences. *Acta Theriologica*, 44: 253–262.
- Caballero A. (1995). On the effective size of populations with separate sexes, with particular reference to sex-linked genes. *Genetics*, 139: 1007–1011.
- Cassel-Lundhagen A. (2010). Peripheral Relict Populations of Widespread Species; Evolutionary Hotspots or Just More of the Same? pp. 267–275. [W]: Haber J.C., Assmann T. (ed.). *Relict Species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W. (1967). Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *The American Journal of Human Genetics*, 19: 233–257.
- Cederlund G., Sand H. (1994). Home-range size in relation to age and sex in moose. *Journal of Mammalogy*, 75: 1005–1012.
- Charlier J., Laikre L., Ryman N. (2008). Genetic structure and evidence of a local bottleneck in moose in Sweden. *Management and Conservation Note*, 72: 411–415.
- Chikuni K., Mori Y., Tabata T., Saito M., Monma M., Kosugiyama M. (1995). Molecular phylogeny based on the kappa-casein and cytochrome *b* sequences in the mammalian suborder Ruminantia. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 859–866.
- Coltman D.W., O'Donoghue P., Jorgenson J.T., Hogg J.T., Strobeck C., Festa-Bianchet M. (2003). Undesirable evolutionary consequences of trophy hunting. *Nature*, 426: 655–658.
- Cox C.B., Moore P.D. (2010). Biogeography: an ecological and evolutionary approach. *Wiley*, USA.
- Crandall K.A., Bininda-Emonds O.R.P., Mace G.M., Wayne R.K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *TREE*, 15: 290–295.
- Cronin M.A., Amstrup S.C., Garner G.W., Vyse E.R. (1991). Interspecific and intraspecific mitochondrial DNA variation in North American bears (*Ursus*). *Canadian Journal of Zoology*, 69: 2985–2992.
- Culling M.A., Janko K., Boroń A., Vasil'ev V.P., Côté I.M., Hewitt G.M. (2006). European colonization by the spined loach (*Cobitis taenia*) from Ponto-Caspian refugia based on mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 15: 173–190.
- Danell K., Bergström R. (2008). The history of moose management in Sweden – an 800 year perspective. 6th International Moose Symposium, Yakutia, Russia.
- Davison J., Ho S.Y.W., Bray S., Korsten M., Tammeleht E., Hindrikson M., Ostbye K., Ostbye E., Lauritzen S.E., Austin J., Cooper A., Saarma U. (2011). Late-Quaternary

- biogeographic scenarios for the brown bear (*Ursus arctos*), a wild mammal model species. *Quaternary Science Reviews*, 30: 418–430.
- De S., Singh R.K., Brahma B. (2011). Allelic Diversity of Major Histocompatibility Complex Class II DRB Gene in Indian Cattle and Buffalo. *Molecular Biology International*, Article ID 120176.
- De Guia A.P.O., Saitoh T. (2007). The gap between the concept and definitions in the Evolutionarily Significant Unit: the need to integrate neutral genetic variation and adaptive variation. *Ecological Research*, 22: 604–612.
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969–1973.
- Dumolin-Lapègue S., Demesure B., Fineschi S., Le Corre V., Petit R.J. (1997). Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, 146: 1475–1487.
- Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571–2581.
- Durka W., Babik W., Ducroz J.F., Heidecke D., Rosell F., Samjaa R., Saveljev A.P., Stubbe A., Ulevičius A., Stubbe M. (2005). Mitochondrial phylogeography of the Eurasian beaver *Castor fiber* L. *Molecular Ecology*, 14: 3843–3856.
- Dzięciółowski R., Pielowski P. (1993). Łoś. Anton-5 Sp. z o.o., Warszawa.
- Edmonds C.A., Lillie A.S., Cavalli-Sforza L.L. (2004). Mutations arising in the wave front of an expanding population. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 101: 975–979.
- Ellegren H., Mikko S., Wallin K., Andersson L. (1996). Limited polymorphism at major histocompatibility complex (MHC) loci in the Swedish moose *A. alces*. *Molecular Ecology*, 5: 3–9.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620.
- Evans P.D., Gilbert S.L., Mekel-Bobrov N., Vallender E.J., Anderson J.R., Vaez-Azizi L.M., Tishkoff S.A., Hudson R.R., Lahn B.T. (2005). *Microcephalin*, a gene regulating brain size, continues to evolve adaptively in humans. *Science*, 309: 1717–1720.
- Excoffier L. (2001). Analysis of population subdivision. pp. 271–307. [W]: Balding D.J., Bishop M., Cannings C. (ed.). *Handbook of statistical genetics*. Chichester, UK: Wiley Chichester.
- Excoffier L. (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13: 853–864.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2006). ARLEQUIN ver 3.1: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Molecular Genetics Population Lab, Institute of Zoology. University of Geneva, Switzerland.
- Excoffier L., Ray N. (2008). Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends in Ecology & Evolution*, 23: 347–351.
- Fedorov V.B., Goropashnaya A.V., Boeskorov G.G., Cook J.A. (2008). Comparative phylogeography and demographic history of the wood lemming (*Myopus schisticolor*): implications for late Quaternary history of the taiga species in Eurasia. *Molecular Ecology*, 17: 598–610.

- Felsenstein J. (1981). Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17: 368–376.
- Felsenstein J. (1984). Distance methods for inferring evolutionary trees: a justification. *Evolution*, 38: 16–24.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Fernández-de-Mera I.G., Vicente J., Pérez de la Lastra J.M., Mangold A.J., Naranjo V., Fierro Y., de la Fuente J., Gortázar C. (2009). Reduced major histocompatibility complex class II polymorphism in a hunter-managed isolated Iberian red deer population. *Journal of Zoology*, 277: 157–170.
- Festa E. (1925). Il capriolo dell'Italia centrale (*Capreolus capreolus italicus* sbsp. nova). *Bollettino del Museo di Zoologia e Anatomia Comparata Dell'università di Torino*, 7: 1–2.
- Finger A., Klank C. (2010). Molecular Methods: Blessing or Curse? pp. 309–320. [W]: Haber J.C., Assmann T. (ed.). *Relict Species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- Flerov K.K. (1952). Fauna of the USSR: Mammals. vol. 1 no 2. Musk deer and deer. *The Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, Russia*.
- Fraser D.J., Bernatchez L. (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10: 2741–2752.
- Fu Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Fu Y.X., Li W.H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693–709.
- Fumagalli L., Hausser J., Taberlet P., Gielly L., Stewart D.T. (1996). Phylogenetic structure of the Holarctic *Sorex araneus* group and its relationship with *S. samniticus*, as inferred from mtDNA sequences. *Hereditas*, 125: 191–199.
- Galtier N., Nabholz B., Glémin S., Hurst G.D.D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18: 4541–4550.
- Garrigan D., Hedrick P.W. (2003). Detecting adaptive molecular polymorphism: Lessons from the MHC. *Evolution*, 57: 1707–1722.
- Gębczyńska Z., Raczyński J. (1984). Habitat preferences and population structure of moose in the Biebrza River Valley. *Acta Zoologica Fennica*, 172: 93–94.
- Gębczyńska Z., Raczyński J. (1993). Problemy ochrony i gospodarowania populacją łosia oraz innych ssaków łownych w Biebrzańskim Parku Narodowym. *Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody*, 12(2): 5–36.
- Gębczyńska Z., Raczyński J. (1997). Ile jest zwierzyny w Biebrzańskim Parku Narodowym? *Parki Narodowe*, 1: 18–19.
- Gębczyńska Z., Raczyński J. (1999). Łoś z zachodniej Polsce. *Łowiec Polski*, 2: 9–12.
- Gębczyńska Z., Raczyński J. (2001). Sytuacja łosia *Alces alces* (L.) w Polsce, zagrożenia i program odbudowy jego populacji. *Chrońmy przyrodę ojczystą*, 4: 35–55.
- Gębczyńska Z., Raczyński J. (2004). Łoś w Kotlinie Biebrzańskiej. pp. 5–19. [W]: *Sytuacja populacji łosia w Polsce*. Biebrza National Park Press, Osowiec.
- Gilbert C., Ropiquet A., Hassanin A. (2006). Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 101–117.
- Goldstein D.B., Schlötterer C. (2000). *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York.

- Goodnight K.F., Queller D.C. (1999). Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology*, 8: 1231–1234.
- Goudet J. (1995). FSTAT (version 2.9.3): A computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485–486.
- Green P.J. (1995). Reversible jump Markov chain Monte Carlo computation and Bayesian model determination. *Biometrika*, 82: 711–732.
- Greenwood P.J. (1980). Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*, 28: 1140–1162.
- Grubb P. (1993). Mammal Species of the world: a taxonomic and geographic reference. pp. 384–392. [W]: Wilson D.E., Reede D.M. (ed.). *Smithsonian Institution Press*, Washington and London.
- Guernier V., Hochberg M.E., Guégan J.F. (2004). Ecology drives the worldwide distribution of human diseases. *PLoS Biology*, 2: 740–746.
- Gugolz D., Bernasconi M.V., Breitenmoser-Würsten C., Wandeler P. (2008). Historical DNA reveals the phylogenetic position of the extinct Alpine lynx. *Journal of Zoology*, 275: 201–208.
- Gullberg A., Olsson M., Tegelström H. (1998). Colonization, genetic diversity, and evolution in the Swedish sand lizard, *Lacerta agilis* (Reptilia, Squamata). *Biological Journal of the Linnean Society*, 65: 257–277.
- Gumiński W. (2003). Big game and sparse forest – relations between mammal species and the surrounding environment at the Prehistoric fishing campsite of Dudka in Masuria, NE-Poland. *Archaeozoologia*, 21: 59–72.
- Gustavsson I., Sundt C.O. (1968). Karyotypes in five species of deer (*Alces alces* L., *Capreolus capreolus* L., *Cervus elaphus* L., *Cervus nippon nippon* Temm., and *Dama dama* L.). *Hereditas*, 60: 233–248.
- Guthrie R.D. (1995). Mammalian evolution in response to the Pleistocene – Holocene transition and the break-up of the mammoth steppe: Two case studies. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 38: 139–154.
- Haanes H., Røed K.H., Solberg E.J., Herfindal I., Sæther B.E. (2011). Genetic discontinuities in a continuously distributed and highly mobile ungulate, the Norwegian moose. *Conservation Genetics*, 12: 1131–1143.
- Habel J.C., Assmann T., Schmitt T., Avise J.C. (2010b). Relict Species: From Past to Future. pp. 1–5. [W]: Haber J.C., Assmann T. (ed.). *Relict Species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- Habel J.C., Drees C., Schmitt T., Assmann T. (2010a). Refugial Areas and Postglacial Colonizations in the Western Palearctic. pp. 189–197. [W]: Haber J.C., Assmann T. (ed.). *Relict Species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- Habel J.C., Schmitt T., Müller P. (2005). The fourth paradigm of post-glacial range expansion of European terrestrial species: the phylogeography of the marbled white butterfly (Satyrinae, Lepidoptera). *Journal of Biogeography*, 32: 1489–1497.
- Hall B.G. (2008). *Phylogenetic Trees Made Easy. A How-to Manual*. Third Edition, Sinauer Associates, Sunderland.
- 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.
- Hallatschek O., Hersen P., Ramanathan S., Nelson D.R. (2007). Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 104: 19926–19930.

- Hallatschek O., Nelson D.R. (2008). Gene surfing in expanding populations. *Theoretical Population Biology*, 73: 158–170.
- Hallatschek O., Nelson D.R. (2009). Life at the front of an expanding population. *Evolution*, 64: 193–206.
- Hamilton G., Currat M., Ray N., Heckel G., Beaumont M., Excoffier L. (2005). Bayesian estimation of recent migration rates after a spatial expansion. *Genetics*, 170: 409–417.
- Hampe A., Petit R.J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, 8: 461–467.
- Harpending H.C. (1994). Signature of Ancient Population Growth in a Low-Resolution Mitochondrial DNA Mismatch Distribution. *Human Biology*, 66: 591–600.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160–174.
- Hassanin A., Delsuc F., Ropiquet A., Hammer C., Jansen van Vuuren B., Matthee C., Ruiz-Garcia M., Catzeflis F., Areskoug V., Nguyen T.T., Couloux A. (2012). Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies*, 335: 32–50.
- Hastings W.K. (1970). Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*, 57: 97–109.
- Hediger R., Ansari H.A., Stranzinger G. (1991). Chromosome banding and gene localizations support extensive conservation of chromosome structure between cattle and sheep. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 57: 12–134.
- Hedrick P.W., Kim K.J. (2000). Genetics of complex polymorphisms: pathogens and maintenance of the major histocompatibility complex variation. pp. 204–234. [W]: Singh R.S., Krimbas C.B. (ed.). *Evolutionary genetics: from molecules to morphology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Heintz E., Poplin F. (1981). *Alces carnutorum* (Laugel, 1862) du Pléistocène de Saint-Pres (France). Systématique et évolution des Alcinés (Cervidae Mammalia). *Quartärpaläontologie Berlin*, 4: 105–122.
- Hellborg L., Ellegren H. (2003). Y chromosome conserved anchored tagged sequences (YCATS) for the analysis of mammalian male-specific DNA. *Molecular Ecology*, 12: 283–291.
- Hellborg L., Ellegren H. (2004). Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 158–163.
- Hellborg L., Gündüz I., Jaarola M. (2005). Analysis of sex-linked sequences supports a new mammal species in Europe. *Molecular Ecology*, 14: 2025–2031.
- Hewitt G.M. (1988). Hybrid zones – natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution*, 3: 158–167.
- Hewitt G.M. (1993). Postglacial distribution and species substructure: lessons from pollen, insects and hybrid zones. pp. 98–123. [W]: Lees D.R., Edwards D. (ed.). *Linnean society symposium 14. Evolutionary patterns and processes*. Academic, London.
- Hewitt G.M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247–276.
- 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. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10: 537–549.
- Hewitt G.M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 359: 183–195.
- Hewitt G.M. (2011a). Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica*, 139: 617–638.
- Hewitt G.M. (2011b). Mediterranean Peninsulas: the evolution of hotspots. pp. 123–147. [W]: Zachos F.E., Habel J.C. (ed.). *Biodiversity Hotspots*.
- Hill E.W., Jobling M.A., Bradley D.G. (2000). Y chromosome variation and Irish origins. *Nature*, 404: 351–352.
- Hmwe S.S., Zachos F.E., Eckert I., Lorenzini R., Fico R., Hartl G.B. (2006). Conservation genetics of the endangered red deer from Sardinia and Mesola with further remarks on the phylogeography of *Cervus elaphus corsicanus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 88: 691–701.
- Hofreiter M., Serre D., Rohland N., Rabeder G., Nagel D., Conard N., Münzel S., Pääbo S. (2004). Lack of phylogeography in European mammals before the last glaciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101: 12963–12968.
- Horn S., Durka W., Wolf R., Ermala A., Stubbe A., Stubbe M., Hofreiter M. (2011). Mitochondrial genomes reveal slow rates of molecular evolution and the timing of speciation in beavers (*Castor*), one of the largest rodent species. *PLoS ONE*, 6: e14622.
- Hsu T.C., Benirschke K. (1973). *An Atlas of Mammalian Chromosomes*. Springer-Verlag, New York.
- Hudson R.R., Slatkin M., Maddison W.P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583–589.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J.P. (2001). Reverend Bayes meets Darwin: Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. Supplementary material. *Science*, 294: 2310–2314.
- Hulme D.J., Silk J.P., Redwin J.M., Barendse W., Beh K.J. (1994). Ten polymorphic ovine microsatellites. *Animal Genetics*, 25: 434–435.
- Hundertmark K.J., Bowyer R.T. (2004). Genetics, evolution, and phylogeography of moose. *Alces*, 40: 103–122.
- Hundertmark K.J., Bowyer R.T., Shields G.F., Schwartz C.C., Smith M.H. (2006). Colonization history and taxonomy of moose *Alces alces* in southeastern Alaska inferred from mtDNA variation. *Wildlife Biology*, 12: 331–338.
- Hundertmark K.J., Shields G.F., Bowyer R.T., Schwartz C.C. (2002b). Genetic relationships deduced from cytochrome-*b* sequences among moose. *Alces*, 38: 113–122.
- Hundertmark K.J., Shields G.F., Udina I.G., Bowyer R.T., Danilkin A.A., Schwartz C.C. (2002b). Mitochondrial phylogeography of moose (*Alces alces*): late Pleistocene divergence and population expansion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22: 375–387.
- Huntley B., Birks H.J.B. (1983). *An Atlas Of Past And Present Pollen Maps For Europe: 0–13000 Years Ago*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hurles M.E., Jobling M.A. (2001). Haploid chromosomes in molecular ecology: lessons from the human Y. *Molecular Ecology*, 10: 1599–1613.

- Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C. (1991). Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128–144.
- Jaarola M., Searle J.B. (2002). Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, 11: 2613–2621.
- Janeway C.A., Travers P., Walport D., Shlomchik M.J. (2004). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York: Garland Publishing.
- Jensen J.L., Bohonak A.J., Kelley S.T. (2005). Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, 6: 13. v.3.23. <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Jędrzejewski W., Nowak S., Kurek R., Mysłajek R.W., Stachura K., Zawadzka B. (2006). Zwierzęta a drogi, metody ograniczania negatywnego wpływu dróg na populacje dzikich zwierząt. Zakład Badania Ssaków Polskiej Akademii Nauk. Białowieża.
- Joger U., Fritz U., Guicking D., Kalyabina-Hauf S., Nagy Z.T., Wink M. (2010). Relict Populations and Endemic Clades in Palearctic Reptiles: Evolutionary History and Implications for Conservation. pp. 119–143. [W]: Haber J.C., Assmann T. (ed.). *Relict Species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- Jukes T.H., Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. pp. 21–132. [W]: Munro H.N. (ed.). *Mammalian protein metabolism*. New York, Academic Press.
- Kahlke H.D. (1990). On the evolution distribution and taxonomy of fossil elk/moose. *Quartärpaläontologie Berlin*, 8: 83–106.
- Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. (2009). FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3: 1–14.
- Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping errors increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099–1106.
- Kangas V.M., Kvist L., Laaksonen S., Nygrén T., Aspi J. (2013). Present genetic structure revealed by microsatellites reflects recent history of the Finnish moose (*Alces alces*). *European Journal of Wildlife Research*, 59: 613–627.
- Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., McGraw R.A., Sonstegard T.S., Smith T.P.L., Lopez-Corrales N.L., Beattie C.W. (1997). A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, 7: 235–249.
- Karpiński J.J. (1951). Łoś (*Alces alces* L.) w Puszczy Białowieskiej. *Chrońmy Przyrodę Ojczyzn*, 11–12: 40–48.
- Keis M., Remm J., Ho S.Y.W., Davison J., Tammelaht E., Tumanov I.L., Saveljev A.P., Männil P., Kojola I., Abramov A.V., Margus T., Saarma U. (2013). Complete mitochondrial genomes and a novel spatial genetic method reveal cryptic phylogeographical structure and migration patterns among brown bears in north-western Eurasia. *Journal of Biogeography*, 40: 915–927.
- Kidjo N., Feracci G., Bideau E., Gonzalez G., Mattéi C., Marchand B., Aulagnier S. (2007). Extirpation and reintroduction of the Corsican red deer *Cervus elaphus corsicanus* in Corsica. *Oryx*, 41: 488–494.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111–120.
- Kimura M. (1983). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kimura M., Crow J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite populations. *Genetics*, 49: 725–738.

- Kimura M., Ohta T. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75: 2868–2872.
- Klein J. (1986). *The Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. New York: Wiley & Sons.
- Klein J., Takahata N., Ayala F.J. (1993). MHC polymorphism and human origins. *Scientific American*, 269: 78–83.
- Klopfstein S., Currat M., Excoffier L. (2006). The fate of mutations surfing on the wave of a range expansion. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 482–490.
- Knopp T., Merilä J. (2009). The postglacial recolonization of Northern Europe by *Rana arvalis* as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Heredity*, 102: 174–181.
- Konnert M., Bergmann F. (1995). The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution*, 196: 19–30.
- Konovalov D.A., Manning C., Henshaw M.T. (2004). KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes*, 4: 779–782.
- Korsten M., Ho S.Y.W., Davison J., Pähn B., Vulla E., Roht M., Tumanov I.L., Kojola I., Andersone-Lilley Z., Ozolins J., Pilot M., Mertzanis Y., Giannakopoulos A., Vorobiev A.A., Markov N.I., Saveljev A.P., Lyapunova E.A., Abramov A.V., Männil P., Valdmann H., Pazetnov S.V., Pazetnov V.S., Rõkov A.M., Saarma U. (2009). Sudden expansion of a single brown bear maternal lineage across northern continental Eurasia after the last ice age: a general demographic model for mammals? *Molecular Ecology*, 18: 1963–1979.
- Kostróń K. (1938). Los evropsky (*Alces alces* L.) v Polsku, vychodnich Prusich a Pobalti. Sbornik Vysoke Skoly Zemedelske v Brne CSR. *Faculta Lesnicka*, nr 98.
- Lachish S., Jones M., McCallum H. (2007). The impact of disease on the survival and population growth rate of the Tasmanian devil. *Journal of Animal Ecology*, 76: 926–936.
- Lagercrantz U., Ryman N. (1990). Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution*, 44: 38–53.
- Lahn B.T., Pearson N.M., Jernalian K. (2001). The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nature Reviews Genetics*, 2: 207–216.
- Larget B., Simon D.L. (1999). Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 750–759.
- Lawrence C.B., Solovyev W. (1994). Assignment of position-specific error probability to primary DNA sequence data. *Nucleic Acids Research*, 22: 1272–1280.
- Lebarbenchon C., Poitevin F., Arnal V., Montgelard C. (2010). Phylogeography of the weasel (*Mustela nivalis*) in the western-Palaearctic region: combined effects of glacial events and human movements. *Heredity*, 105: 449–462.
- Lenkowa A., Panfil J. (1973). Łoś na ziemiach polskich. *Studia Naturae, Seria B*, nr 25. Warszawa – Kraków.
- Lento G.M., Baker C.S., David V., Yuhki N., Gales N.J., O'Brien S.J. (2003). Automated single-strand conformation polymorphism reveals low diversity of a Major Histocompatibility Complex Class II gene in the threatened New Zealand sea lion. *Molecular Ecology Notes*, 3: 346–349.

- Lesica P., Allendorf F.W. (1995). When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology*, 9: 753–760.
- Librado P., Rozas J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Lindgren G., Backström N., Swinburne J., Hellborg L., Einarsson A., Sandberg K., Cothran G., Vilà C., Binns M., Ellegren H. (2005). Limited number of patriline in horse domestication. *Nature Genetics*, 36: 335–336.
- Linnaeus C. (1758). *Systema Naturae*. 10th Edition. Stockholm.
- Lister A.M. (1993). Evolution of mammoths and moose: The Holarctic perspective. pp. 178–204. [W]: Barnosky A.D. (ed.). *Quaternary Mammals of North America*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Liu W.S., Beattie C.W., de Leon F.A.P. (2003). Bovine Y chromosome microsatellite polymorphisms. *Cytogenetic and Genome Research*, 102: 53–58.
- Liu W.S., Mariani P., Beattie C.W., Alexander L.J., de Leon F.A.P. (2002). A radiation hybrid map for the bovine Y chromosome. *Mammalian Genome*, 13: 320–326.
- Liukkonen-Anttila T., Uimaniemi L., Orell M., Lumme J. (2002). Mitochondrial DNA variation and the phylogeography of the grey partridge (*Perdix perdix*) in Europe: from Pleistocene history to present day populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 971–982.
- Loehr J., Worley K., Grapputo A., Carey J., Veitch A., Coltman D.W. (2006). Evidence for cryptic glacial refugia from North American mountain sheep mitochondrial DNA. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 419–430.
- Loftus R.T., McHugh D.E., Bradley D.G., Sharp P.M., Cunningham P. (1994). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 91: 2757–2761.
- Lomolino M.V., Riddle B.R., Brown J.H. (2006). *Biogeography*. Sinauer Associates, Sunderland, MA USA.
- Lorenzini R., Lovari S., Masseti M. (2002). The rediscovery of the Italian roe deer: genetic differentiation and management implications. *Italian Journal of Zoology*, 69: 367–379.
- Lublinerówna K. (1935). Rezerwat leśny “Grzędy” pod Rajgrodem. *Ochrona przyrody*, 15: 67–75.
- Mainguy J., Worley K., Côté S.D., Coltman D.W. (2007). Low MHC *DRB* class II diversity in the mountain goat: past bottlenecks and possible role of pathogens and parasites. *Conservation Genetics*, 8: 885–891.
- Mao X., Zhang J., Zhang S., Rossiter S.J. (2010). Historical male-mediated introgression in horseshoe bats revealed by multilocus DNA sequence data. *Molecular Ecology*, 19: 1352–1366.
- Markgren G. (1974). The moose in Fennoscandia. *Naturaliste Canadien*, 101 :185–194.
- Marsh S.G.E., Bodmer J.G. (1990). HLA-*DRB* nucleotide sequences. *Immunogenetics*, 31: 141–144.
- Mason R.A.B., Browning T.L., Eldridge M.D.B. (2010). Reduced MHC class II diversity in island compared to mainland populations of the black-footed rock-wallaby (*Petrogale lateralis lateralis*). *Conservation Genetics*, 12: 91–103.
- Matosiuk M., Borkowska A., Świsłocka M., Mirski P., Borowski Z., Krysiuk K., Zvyhaynaya E., Danilkin A.A., Saveljev A., Ratkiewicz M. (2013). Unexpected population genetic structure of European roe deer in Poland: an invasion of the mtDNA genome from Siberian roe deer (*w recenzji*).

- Mau B., Newton M.A. (1997). Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 6: 122–131.
- Mau B., Newton M.A., Larget B. (1999). Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*, 55: 1–12.
- McDevitt A.D., Yannic G., Rambau R.V., Hayden T.J., Searle J.B. (2010). Postglacial recolonization of continental Europe by the pygmy shrew (*Sorex minutus*) inferred from mitochondrial and Y chromosomal DNA sequences. pp. 217–236. [W]: Haber J.C., Assmann T. (ed.). *Relict Species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- McDevitt A.D., Zub K., Kawałko 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. *Biological Journal of the Linnean Society*, 106: 57–69.
- Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.H., Teller E. (1953). Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21: 1087–1092.
- Mikko S., Andersson L. (1995). Low major histocompatibility complex class II diversity in European and North American moose. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 92: 4259–4263.
- Mikko S., Røed K., Schmutz S., Andersson L. (1999). Monomorphism and polymorphism at *MHC DRB* loci in domestic and wild ruminants. *Immunological Reviews*, 167: 169–178.
- Montanaro P., De Marinis A.M., Riga F., Focardi S., Toso S. (2003). Variabilità craniometrica in alcune popolazioni italiane di Capriolo. pp. 14: 169–170. [W]: Prigioni C., Meriggi A., Merli E. (ed.). *Atti IV Congresso Italiano Di Teriologia. Hystrix*.
- Moore S.S., Barendse W., Berger K.T., Armitage S.M., Hetzel D.J.S. (1992). Bovine and ovine DNA microsatellites from the EMBL and GENBANK database. *Animal Genetics*, 23: 463–467.
- Moore S.S., Byrne K., Berger K.T., Barendse W., McCarthy F., Womack J.E., Hetzel D.J. (1994). Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mammalian Genome*, 5: 84–90.
- Moritz C. (1994). Defining evolutionarily significant units for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9: 373–375.
- Moritz C. (1995). Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions for the Royal Society London B*, 349: 113–118.
- Moritz C. (1999). Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*, 130: 217–228.
- Moritz C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, 51: 238–254.
- Mossman C.A., Waser P.M. (1999). Genetic detection of sex-biased dispersal. *Molecular Ecology*, 8: 1063–1067.
- Naidu A., Fitak R.R., Munguia-Vega A., Culver M. (2012). Novel primers for complete mitochondrial cytochrome *b* gene sequencing in mammals. *Molecular Ecology Resources*, 12: 191–196.
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.

- Nei M., Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford.
- Nei M., Li W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 76: 5269–5273.
- Neigel J.E. (2002). Is F_{ST} obsolete? *Conservation Genetics*, 3: 167–173.
- Nève G., Verlaque R. (2010). Genetic Differentiation Between and Among Refugia. pp. 277–294. [W]: Haber J.C., Assmann T. (ed.). *Relict Species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- Nichols R.A., Hewitt G.M. (1994). The genetic consequences of long distance dispersal during colonization. *Heredity*, 72: 312–317.
- Niedziałkowska M. (2008). Struktura genetyczna populacji jelenia *Cervus elaphus* w puszczech północno-wschodniej Polski. Ph.D. dissertation, Mammal Research Institute, Polish Academy of Science, Białowieża, and University of Warsaw, Warsaw, Poland.
- Niedziałkowska M., Fontaine M.C., Jędrzejewska B. (2012). Factors shaping gene flow in red deer (*Cervus elaphus*) in seminatural landscapes of central Europe. *Canadian Journal of Zoology*, 90: 150–162.
- Niedziałkowska M., Jędrzejewska B., Honnen A.C., Otto T., Sidorovich V.E., Perzanowski K., Skog A., Hartl G.B., Borowik T., Bunevich A.N., Lang J., Zachos F.E. (2011). Molecular biogeography of red deer *Cervus elaphus* from eastern Europe: insights from mitochondrial DNA sequences. *Acta Theriologica*, 56: 1–12.
- Nielsen E.E., Hansen M.M., Ruzzante D.E., Meldrup D., Grønkjær P. (2003). Evidence of a hybrid-zone in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic and the Danish Belt Sea revealed by individual admixture analysis. *Molecular Ecology*, 12: 1497–1508.
- Nikula R., Fraser C.I., Spencer H.G., Waters J.M. (2010). Circumpolar dispersal by rafting in two subantarctic kelp-dwelling crustaceans. *Marine Ecology Progress Series*, 405: 221–230.
- Nishida S., Pastene L.A., Goto M., Koike H. (2003). *SRY* gene structure and phylogeny in the cetacean species. *Mammal Study*, 28: 57–66.
- Nygrén T. (2009). Biology and policies in Finnish moose population regulation and management. Dissertation. University of Joensuu, Finland.
- Nygrén T., Danilov P., Nugren T. (2008). The dynamics and management of north European moose. 6th International Moose Symposium. Yakutia, Russia.
- Ohno S. (1973). Ancient linkage groups and frozen accidents. *Nature*, 244: 259–262.
- Oliver M.K., Lambin X., Cornulier T., Piertney S.B. (2009). Spatio-temporal variation in the strength and mode of selection acting on major histocompatibility complex diversity in water vole (*Arviloca terrestris*) metapopulations. *Molecular Ecology*, 18: 80–92.
- Olivieri G.L., Sousa V., Chikhi L., Radespiel U. (2008). From genetic diversity and structure to conservation: genetic signature of recent population declines in three mouse lemur species (*Microcebus* spp.). *Biological Conservation*, 141: 1257–1271.
- Orsini L., Corander J., Alasentie A., Hanski I. (2008). Genetic spatial structure in a butterfly metapopulation correlates better with past than present demographic structure. *Molecular Ecology*, 17: 2629–2642.
- Oshida T., Abramov A., Yanagawa H., Masuda R. (2005). Phylogeography of the Russian flying squirrel (*Pteromys volans*): implication of refugia theory in arboreal small mammal of Eurasia. *Molecular Ecology*, 14: 1191–1196.

- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354.
- Paetkau D., Slade R., Burden M., Estoup A. (2004). Direct, real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 13: 55-65.
- Pala M., Olivieri A., Achilli A., Accetturo M., Metspalu E., Reidla M., Tamm E., Karmin M., Reisberg T., Kashani B.H., Perego U.A., Carossa V., Gandini F., Pereira J.B., Soares P., Angerhofer N., Rychkov S., Al-Zahery N., Carelli V., Sanati M.H., Houshmand M., Hatina J., Macaulay V., Pereira L., Woodward S.R., Davies W., Gamble C., Baird D., Semino O., Villems R., Torroni A., Richards M.B. (2012). Mitochondrial DNA Signals of Late Glacial Recolonization of Europe from Near Eastern Refugia. *The American Journal of Human Genetics*, 90: 915-924.
- Palumbi S.R., Baker C.S. (1994). Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 426-435.
- Panov N.K. (1999). History of development of vegetation of a mountain part of the Southern Urals Mountains in the late Pleistocene and Holocene, on paleontological data. pp. 144-158. [W]: Smirnova N.G. (ed.). *Historical Ecology of Animals in the Southern Ural Mountains*. Russia.
- Paterson S., Wilson K., Pemberton J.M. (1998). Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 95: 3714-3719.
- Payen E.J., Cotinot C.Y. (1994). Sequence evolution of SRY gene within *Bovidae* family. *Mammalian Genome*, 5: 723-725.
- Peakall R., Smouse P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pemberton J.M., Slate J., Bancroft D.R., Barrett J.A. (1995). Nonamplifying alleles at microsatellite loci: A caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4: 249-252.
- Peters J.L., Gretes W., Omland K.E. (2005). Late Pleistocene divergence between eastern and western populations of wood ducks (*Aix sponsa*) inferred by the 'isolation with migration' coalescent method. *Molecular Ecology*, 14: 3407-3418.
- Petit R.J., Bialozyt R., Garnier-Géré P., Hampe A. (2003). Ecology and genetics of tree invasions: from recent introductions to Quaternary migrations. *Forest Ecology and Management*, 197: 117-137.
- Pérez-Espona S., Pérez-Barbería F.J., Goodall-Copestak W.P., Jiggins C.D., Gordon I.J., Pemberton J.M. (2009). Genetic diversity and population structure of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*) populations: a mitochondrial survey. *Heredity*, 102: 199-210.
- Pérez-Tris J., Bensch S., Carbonell R., Helbig A.J., Tellería J.L. (2004). Historical diversification of migration patterns in a passerine bird. *Evolution*, 58: 1819-1832.
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A. (2004). GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, 95: 536-539.
- Posada D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256.

- Posada D., Krandall K.A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 37–45.
- Prado C.P.A., Haddad C.F.B., Zamudio K.R. (2012). Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Molecular Ecology*, 21: 921–941.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.J. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Pritchard J.K., Wen X., Falush D. (2010). Documentation for *structure* software: Version 2.3. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>
- Proudfoot G.A., Honeycutt R.L., Slack R.D. (2006). Mitochondrial DNA variation and phylogeography of the ferruginous pygmy-owl (*Glaucidium brasilianum*). *Conservation Genetics*, 7: 1–12.
- Provan J., Bennett K.D. (2008). Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology & Evolution*, 23: 564–571.
- Prugnolle F., Manica A., Charpentier M., Guégan J.F., Guernier V., Balloux F. (2005). Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Current Biology*, 15: 1022–1027.
- Pucek Z. (ed.) (1984). *Klucz do oznaczania ssaków Polski*. PWN. Warszawa.
- Pucek Z., Raczyński J. (1983). Atlas rozmieszczenia ssaków w Polsce. Warszawa: PWN.
- Raczyński J. (2006). Łoś w Polsce: stan i perspektywy. pp. 25–38. [W]: *Czy jest miejsce dla losia?* Uroczysko Supraśl.
- Radwan J., Biedrzycka A., Babik W. (2010). Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? *Biological Conservation*, 143: 537–544.
- Radwan J., Kawałko A., Wójcik J.M., Babik W. (2007). MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Molecular Ecology*, 16: 531–540.
- Ramachandran S., Deshpande O., Roseman C.C., Rosenberg N.A., Feldman M.W., Cavalli-Sforza L.L. (2005). Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 102: 15942–15947.
- Rambaut A. (2009). FigTree v1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Randi E., Alves P.C., Carranza J., Milošević-Zlatanović S., Sfougaris A., Mucci N. (2004). Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology*, 13: 3071–3083.
- Randi E., Mucci N. (2001). Genetic structure and origin of roe deer populations in Italy. p. 5. [W]: Focardi S. (ed.). *Proceedings of the 3rd Roe Deer International Symposium (Abstracts)*, Tredozio (BO), Italy. INFS, Bologna.
- Randi E., Pierpaoli M., Danilkin A. (1998.) Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*). *Heredity*, 80: 429–437.
- Rannala B., Mountain J.L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94: 9197–9201.
- Rannala B., Yang Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 304–311.
- Ratkiewicz M. (2006). Od genetyki do genomiki populacji: nowe perspektywy badań w ekologii i biologii ewolucyjnej. *Kosmos*, 55: 129–136.

- Ratkiewicz M., Matusiuk M., Kowalczyk R., Konopiński M.K., Okarma H., Ozolins J., Männil P., Ornicans A., Schmidt K. (2012). High levels of population differentiation in Eurasian lynx at the edge of the species' western range in Europe revealed by mitochondrial DNA analyses. *Animal Conservation*, 15: 603–612.
- Ray N., Currat M., Excoffier L. (2003). Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 76–86.
- Rogers A.R. (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49: 608–615.
- Rogers A.R., Harpending H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Rosenberg N.A., Woolf E., Pritchard J.K., Schaap T., Gefel D., Shpirer I., Lavi U., Bonn -Tamir B., Hillel J., Feldman M.W. (2001). Distinctive genetic signatures in the Libyan Jews. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98: 858–863.
- Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., Frankish A., Lovell F.L., Howe K.L., Ashurst J.L., Fulton R.S. i inni (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, 434: 325– 337.
- Rousset F. (2008). GENEPOP'007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- Rowe K.C., Heske E.J., Brown P.W., Paige K.N. (2004). Surviving the ice: Northern refugia and postglacial colonization. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101: 10355–10359.
- R ed K.H., Midthjell L. (1998). Microsatellites in reindeer, *Rangifer tarandus*, and their use in other cervids. *Molecular Ecology*, 7: 1773–1776.
- Ruzzante D.E., Walde S.J., Gosse J.C., Cussac V.E., Habit E., Zemlak T.S., Adams E.D.M. (2008). Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology*, 17: 2234–2244.
- R lcker J., St lfelt F. (1986). Das Elchwild. Naturgeschichte,  kologie, Hege und Jagd des europ ischen Elches. Hamburg, Berlin: Paul Parey.
- Ryder O.A. (1986). Species conservation and the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, 1: 9–10.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425.
- Samojlik T. (2005). Ochrona i  owy. Puszcza Bia owieska w czasach kr lewskich. Zak ad Badania Ssak w Polskiej Akademii Nauk. Bia owie a.
- Schaschl H., Wandeler P., Suchentrunk F., Obexer-Ruff G., Goodman S.J. (2006). Selection and recombination drive the evolution of MHC class II DRB diversity in ungulates. *Heredity*, 97: 427–437.
- Schmitt T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*, 4: 1–13.
- Schm lcke U., Zachos F.E. (2005). Holocene distribution and extinction of the moose (*Alces alces*, Cervidae) in Central Europe. *Mammalian Biology*, 70: 329–344.
- Seddon J.M., Baverstock P.R. (1999). Variation on islands: major histocompatibility complex (MHC) polymorphism in populations of the Australian bush rat. *Molecular Ecology*, 8: 2071–2079.
- Semagn K., Bj rnstad A., Ndjiondjop M.N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 2540–2568.

- Semino O., Passarino G., Oefner P.J., Lin A.A., Arbuzova S., Beckman L.E., De Benedictis G., Francalacci P., Kouvatsi A., Limborska S., Marcikiai M., Mika A., Mika B., Primorac D., Santachiara-Benerecetti A.S., Cavalli-Sforza L.L., Underhill P.A. (2000). The genetic legacy of Paleolithic *Homo sapiens sapiens* in extant Europeans: A Y chromosome perspective. *Science*, 290: 1155–1159.
- Sipko T.P., Kholodova M.V. (2009). Fragmentation of Eurasian moose populations during periods of population depression. *Alces*, 45: 25–34.
- Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J., Cordum H.S., Hillier L.D., Brown L.G., Repping S., Pyntikova T., Ali J., Bieri T., Chinwalla A., Delehaunty A., Delehaunty K., Du H., Fewell G., Fulton L., Fulton R., Graves T., Hou S.F., Latrielle P., Leonard S., Mardis E., Maupin R., McPherson J., Miner T., Nash W., Nguyen C., Ozersky P., Pepin K., Rock S., Rohlfing T., Scott K., Schultz B., Strong C., Tin-Wollam A., Yang S.P., Waterston R.H., Wilson R.K., Rozen S., Page D.C. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423: 825–837.
- Skog A., Zachos F.E., Rueness E.K., Feulner P.G.D., Mysterud A., Langvatn R., Lorenzini R., Hmwe S.S., Lehoczy I., Hartl G.B., Stenseth N.C., Jakobsen K.S. (2009). Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *Journal of Biogeography*, 36: 66–77.
- Slatkin M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457–462.
- Slatkin M., Hudson R.R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129: 555–562.
- Sommer R.S., Nadachowski A. (2006). Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review*, 36: 251–265.
- Sommer R.S., Zachos F.E. (2009). Fossil evidence and phylogeography of temperate species: ‘glacial refugia’ and post-glacial recolonization. *Journal of Biogeography*, 36: 2013–2020.
- Sommer S., Schwab D., Ganzhorn J.U. (2002). MHC diversity of endemic Malagasy rodents in relation to geographic range and social system. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51: 214–221.
- Soranzo N., Bufe B., Sabeti P.C., Wilson J.F., Weale M.E., Marguerie R., Meyerhof W., Goldstein D.B. (2005). Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16. *Current Biology*, 15: 1257–1265.
- Spielman D., Brook B.W., Frankham R. (2004). Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 15261–15264.
- Steffen P., Eggen A., Dietz A.B., Womack J.E., Stranzinger G., Fries R. (1993). Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics*, 24: 121–124.
- Steinbach H.J. (2009). Elchwild überlebt in Ostpreußen. *Wild und Hund*, 17: 17–21.
- Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R.G., Vigilant L., Erlich H.A. (1991). Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *The American Journal of Human Genetics*, 48: 370–382.
- Stoneking M., Sherry S.T., Red A.J., Vigilant L. (1992). New Approaches to Dating Suggest a Recent Age for the Human mtDNA Ancestor. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*, 337: 167–175.

- Støen O.G., Zedrosser A., Sæbø S., Swenson J.E. (2006). Inversely density-dependent natal dispersal in brown bears *Ursus arctos*. *Oecologia*, 148: 356–364.
- Swarbrick P.A., Dietz A.B., Womack J.E., Crawford A.M. (1992). Ovine and bovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF46 locus. *Animal Genetics*, 23: 182.
- Swenson J.E., Taberlet P., Bellemain E. (2011). Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos*. *Mammal Review*, 41: 87–98.
- Świsłocka M., Czajkowska M., Duda M., Danyłow J., Owadowska-Cornil E., Ratkiewicz M. (2013a). Complex patterns of population genetic structure of moose, *Alces alces*, after recent spatial expansion in Poland revealed by sex-linked markers. *Acta Theriologica*, 58: 367–378.
- Świsłocka M., Ratkiewicz M., Borkowska A. (2013b). Unikalny charakter populacji łośia w dolinie Biebrzy. pp. 41 – 47. [W]: Taylor J.R.E. (ed.). *Tajemnice doliny Biebrzy – eseje naukowe o zwierzętach i roślinach*”. Trans Humana, Białystok.
- Świsłocka M., Ratkiewicz M., Borkowska A., Komenda E., Raczyński J. (2008). Mitochondrial DNA diversity in moose, *Alces alces* from Northeastern Poland: evidence for admixture in bottlenecked relic population in the Biebrza valley. *Annales Zoologici Fennici*, 45: 360–365.
- Świsłocka M., Ratkiewicz M., Raczyński J., Duda N., Borkowska A., Komenda E. (2009). Zróżnicowanie mitochondrialnego DNA oraz przepływ genów między populacjami łośia (*Alces alces* L.) w Dolinie Biebrzy i Puszczy Augustowskiej. *Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody*, 28: 95–106.
- Šimková A., Ottová E., Morand S. (2006). MHC variability, life-traits and parasite diversity of European cyprinid fish. *Evolutionary Ecology*, 20: 465–477.
- Taberlet P., Bouvet J. (1994). Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society London B*, 255: 195–200.
- Taberlet P., Fumagalli L., Hausser J. (1994). Chromosomal versus mitochondrial DNA evolution: tracking the evolutionary history of the southwestern European populations of the *Sorex araneus* Group (Mammalia, Insectivora). *Evolution*, 48: 623–636.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cosson J.C. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453–464.
- Tajima F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- 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.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Tatarinov K.A. (1973). Fauna khrebetnikh zakhodu Ukraini. Lviv, Ukraine.
- Tavaré S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17: 57–86.
- Thouveny N., Bonifay E. (1984). New chronological data on European Plio-Pleistocene faunas and hominid occupation sites. *Nature*, 308: 355–358.

- Travis J.M.J., Münkemüller T., Burton O.J., Best A., Dytham C., Johst K. (2007). Deleterious mutations can surf to high densities on the wave front of an expanding population. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 2334–2343.
- Tucker P.K., Lundrigan B.L. (1993). Rapid evolution of the sex determining locus in old world mice and rats. *Nature*, 364: 715–717.
- Udina I.G., Danilkin A.A., Boeskorov G.G. (2002). Genetic diversity of moose (*Alces alces* L.) in Eurasia. *Russian Journal of Genetics*, 38: 951–957.
- Underhill P.A., Shen P., Lin A.A., Jin L., Passarino G., Yang W.H., Kauffman E., Bonnét-Tamir B., Bertranpetit J., Francalacci P., Ibrahim M., Jenkins T., Kidd J.R., Mehdi S.Q., Seielstad M.T., Wells R.S., Piazza A., Davis R.W., Feldman M.W., Cavalli-Sforza L.L., Oefner P.J. (2000). Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nature Genetics*, 26: 358–361.
- Ursenbacher S., Carlsson M., Helfer V., Tegelström H., Fumagalli L. (2006). Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, 15: 3425–3437.
- Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lepingle A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio S.L., Martin P., Leveziel H., Guerin G. (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome*, 5: 288–297.
- Vaiman D., Osta D., Mercier D., Grohs C., Leveziel H. (1992). Characterization of five new bovine dinucleotide repeats. *Animal Genetics*, 23: 537.
- Valdiosera C.E., García-Garitagoitia J.L., Garcia N., Doadrio I., Thomas M.G., Hänni C., Arsuaga J.L., Barnes I., Hofreiter M., Orlando L., Götherström A. (2008). Surprising migration and population size dynamics in ancient Iberian brown bears (*Ursus arctos*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 5123–5218.
- Van Den Bussche R.A., Hooper S.R., Lochmiller R.L. (1999). Characterization of Mhc-DRB allelic diversity in whitetailed deer (*Odocoileus virginianus*) provides insight into Mhc-DRB allelic evolution within Cervidae. *Immunogenetics*, 49: 429–437.
- Van Den Bussche R.A., Ross T.G., Hooper S.R. (2002). Genetic variation at a major histocompatibility locus within and among populations of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Mammalogy*, 83: 31–39.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.
- Vernesi C., Pecchioli E., Caramelli D., Tiedemann R., Randi E., Bertorelle G. (2002). The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus capreolus*) populations in the Alps and central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe. *Molecular Ecology*, 11: 1285–1297.
- Von Koenigswald W. (2002). Lebendige Eiszeit Klima und Tierwelt im Wandel. Darmstadt: Wissenschaftliche Buchgesellschaft.
- Wahlund S.G.W. (1928). Composition of populations from the perspective of the theory of heredity. *Hereditas*, 11: 65–105.
- Wan Q.H., Wu H., Fujihara T., Fang S.G. (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, 25: 2165–2176.
- Waples R.S. (1991). Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of a “species” under the Endangered Species Act. *Marine Fisheries Review*, 53: 11–22.

- Waters J.M., Fraser C.I., Hewitt G.M. (2013). Founder takes all: density-dependent processes structure biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 28: 78–85.
- Watterson G.A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7: 256–276.
- Weber D.S., Stewart B.S., Schienman J., Lehman N. (2004). Major histocompatibility complex variation at three class II loci in the northern elephant seal. *Molecular Ecology*, 13: 711–718.
- Weber D.S., Van Coeverden De Groot P.J., Peacock E., Schrenzel M.D., Perez D.A., Thomas S., Shelton J.M., Else C.K., Darby L.L., Acosta L., Harris C., Youngblood J., Boag P., Desalle R. (2013). Low MHC variation in the polar bear: implications in the face of Arctic warming? *Animal Conservation*, 1–13.
- Wegner K.M., Reusch T.B.H., Kalbe M. (2003). Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 224–232.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Weiss S., Ferrand N. (2007). *Phylogeography of Southern European Refugia*. Springer.
- Wemmer C. (1998). *Deer. Status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC Deer Specialist Group, Gland, Switzerland.
- Whitfield L.S., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. (1993). Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene *SRY*. *Nature*, 364: 713–715.
- Willms C. (1987). Der Elch (*Alces alces* L.) im nacheiszeitlichen Europa Eine paläozoogeographische Untersuchung auf quantitativer Ebene. *Archaeologia Polski*, 32: 249–291.
- Wilson A.A., Carlson S.S., White T.J. (1977). Biochemical evolution. *Annual Review of Biochemistry*, 46: 573–639.
- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllensten U.B., Helm-Bychowski K.M., Higuchi R.G., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D., Stoneking M. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375–400.
- Wilson A.C., Ochman H., Prager E.M. (1987). Molecular time scale for evolution. *Trends in Genetics*, 3: 241–247.
- Wilson G.A., Strobeck C., Wu L., Coffin J.W. (1997). Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. *Molecular Ecology*, 6: 697–699.
- Wilson P.J., Grewal S., Rodgers A., Rempel R., Saquet J., Hristienko H., Burrows F., Peterson R., White B.N. (2003). Genetic variation and population structure of moose (*Alces alces*) at neutral and functional DNA loci. *Canadian Journal of Zoology*, 81: 670–683.
- Wójcik J.M. (1993). Chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* in Poland: a model of karyotype evolution. *Acta Theriologica*, 38: 315–338.
- Wójcik J.M., Kawałko A., Marková S., Searle J.B., Kotlík P. (2010). Phylogeographic signatures of northward post-glacial colonization from high-latitude refugia: a case study of bank voles using museum specimens. *Journal of Zoology*, 281: 249–262.
- Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323–354.
- Wright S. (1978). *Evolution and the genetics of population. Vol 4. Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press. Chicago.

- Wyrost P. (1993). The fauna of ancient Poland in the light of archaeozoological research. pp. 251–259. [W]: Clason A.T., Payne S., Uerpmann H.P. (ed.). *Skeletons in her Cupboard Festschrift für Juliet Clutton-Brock*. Oxford: *Oxbow Monograph*.
- Xue Y., Daly A., Yngvadottir B., Liu M., Coop G., Kim Y., Sabeti P., Chen Y., Stalker J., Huckle E., Burton J., Leonard S., Rogers J., Tyler-Smith C. (2006). Spread of an inactive form of caspase-12 in humans is due to recent positive selection. *The American Journal of Human Genetics*, 78: 659–670.
- Yang Z., Rannala B. (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 717–724.
- Yasukochi Y., Kurosaki T., Yoneda M., Koike H., Satta Y. (2012). MHC class II *DQB* diversity in the Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 230.
- Zachos F.E., Hajji G.M., Hmwe S.S. (2010). Conservation genetics and phylogeography of the threatened Corsican and Barbary Red Deer (*Cervus elaphus corsicanus* and *C. e. barbarus*). pp. 159–171. [W]: Haber J.C., Assmann T. (ed.). *Relict Species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- Zachos F.E., Otto M., Unici R., Lorenzini R., Hartl G.B. (2008). Evidence of a phylogeographic break in the Romanian brown bear (*Ursus arctos*) population from the Carpathians. *Mammalian Biology*, 73: 93–101.
- Zhang D., Hewitt G.M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: Practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563–584.
- Zimmermann M., Vischer-Leopold M., Ellwanger G., Ssymank A., Schröder E. (2010). The EU Habitats Directive and the German Natura 2000 Network of Protected Areas as Tool for Implementing the Conservation of Relict Species. pp. 323–340. [W]: Haber J.C., Assmann T. (ed.). *Relict Species. Phylogeography and Conservation Biology*.
- Zuckerkindl E., Pauling L.B. (1962). Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. pp. 189–225. [W]: Kasha M., Pullman B. (ed.). *Horizons in Biochemistry*. Academic Press, New York.