

Krótkie wprowadzenie do filogeografii dla botaników

Paweł WĄSOWICZ

WĄSOWICZ P. 2011. **A short introduction to phylogeography for botanists.** *Wiadomości Botaniczne* 55(1/2): 27–39.

‘Phylogeography is a field of study concerned with the principles and processes governing the geographic distributions of genealogical lineages, especially those within and among closely related species’ (Avice 2000). The article briefly summarizes the most important information on phylogeography and its conceptual background: presents phylogeography as a field of research, shows cpDNA as the most informative molecule in phylogeographic research in plants and introduces the reader to the concept of phylogeographic structure. In the second part of the paper the most important information on phylogeographic patterns in European plant populations is given and briefly summarized.

KEY WORDS: phylogeography, population genetic structure, cpDNA

Paweł Wąsowicz, Wydział Biologii i Nauk o Środowisku, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego, ul. Wóycickiego 1/3, 01-938 Warszawa, e-mail: p.wasowicz@uksw.edu.pl

WSTĘP

Zależności i związki łączące różne populacje organizmów żywych są przedmiotem wielu współcześnie prowadzonych badań biologicznych. W analizach tego typu posłużyć się można wieloma metodami poczynając od narzędzi morfologicznych, kończąc na ekologicznych, a nawet fizjologicznych. Można więc, prowadząc obserwacje morfologii osobników z każdej badanej populacji oraz dokonując ich pomiarów, powiedzieć, czy i na ile są one do siebie podobne. Można badać zmienne demografii populacji, takie jak natężenie migracji, śmiertelność, rozrodczość i inne. Prowadzi się także badania mające na celu porównanie fizjologicznej reakcji osobników w badanych populacjach na jeden lub kilka czynników środowiskowych.

Wszystkie te badania, jakkolwiek potrzebne, niewiele powiedzą nam jednak o historycznych więzach łączących badane populacje. Informacja taka, konieczna w dociekaniach nad ewolucją gatunków, nad genezą ich rozmieszczenia i migracjami, a więc nad tym, co nazwać można „historią ewolucyjną gatunków”, staje się dostępna dla badacza, jeśli sięgnie on po metody filogeografii.

Początki rozwoju tego prężnego obecnie kierunku badań datować można na rok 1987, kiedy to Avice i współpracownicy (Avice et al. 1987) zdefiniowali filogeografię oraz obszar jej zainteresowań i przedstawili pierwsze hipotezy filogeograficzne.

Filogeografia roślin długo pozostawała w tyle za analogicznymi badaniami nad zwierzętami. Pomimo tego, że obecny stan wiedzy na

temat wzorców filogeograficznych u roślin jest już pokaźny, to wiele pytań i zagadnień oczekuje jeszcze na odpowiedź udzieloną z wykorzystaniem narzędzi i metod filogeografii.

Prezentowany artykuł ma za zadanie przybliżyć filogeografię, jej zasady i istotę badań. Nie jest to całościowy systematyczny wykład przedmiotu, raczej subiektywny wybór ważniejszych zagadnień istotnych dla zrozumienia filogeografii. Ponieważ artykuł przeznaczony jest dla botaników, nie porusza on prawie w ogóle zagadnień z szeroko ujętego zakresu filogeografii.

DEFINICJA FILOGEOGRAFII

Definicja filogeografii zaproponowana została przez jej pomysłodawcę, „ojca założyciela”, jak w wielu tekstach określa się Johna C. Avise’a, amerykańskiego genetyka. W tej klasycznej definicji całego pola badawczego Avise proponuje używanie terminu filogeografia (ang. *phylogeography*) jako nazwy obszaru badań zajmującego się „poznaniem zasad i procesów rządzących geograficznym rozmieszczeniem linii rodowych, a w szczególności tych w obrębie jednego gatunku lub pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami”¹ (Avise 2000). Jest więc filogeografia niczym innym, jak dociekaniami różnorodnych zależności istniejących pomiędzy genealogiami genów, filogenetyką, a geografiami. Bada aspekty historyczne i filogenetyczne (filo) zmienności genetycznej i zróżnicowania wewnątrzgatunkowego w relacji do geograficznego rozmieszczenia gatunków (geografia). Celem badań filogeograficznych jest spojrzenie na zmienność genetyczną w badanych populacjach oraz na stosunki genealogiczne genów w kontekście czasu i przestrzeni (rozmieszczenia geograficznego). Ta naczelna zasada i idea badań filogeograficznych przedstawiona została na Ryc. 1.

¹ *‘Phylogeography is a field of study concerned with the principles and processes governing the geographic distributions of genealogical lineages, especially those within and among closely related species.’* (Avise 2000)

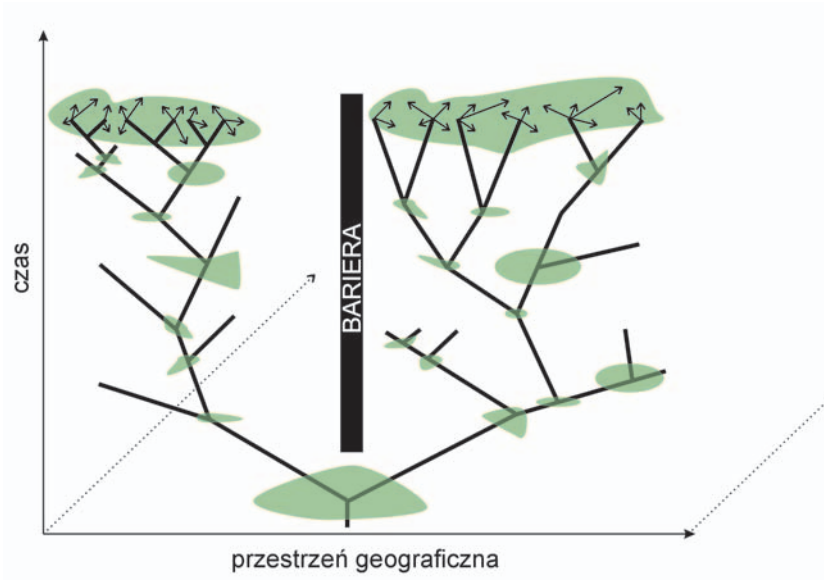
Tak ukierunkowane badania filogeograficzne bazują głównie na danych dostarczanych przez analizę zmienności genetycznej badanych organizmów, a więc informacjach uzyskanych na drodze doświadczeń prowadzonych metodami biologii molekularnej. Dla potrzeb szerszych analiz i interpretacji korzystają także z uzupełniających danych i osiągnięć innych dyscyplin biologicznych, takich jak: genetyka populacyjna, etologia, demografia, filogenetyka, biogeografia, czy paleontologia. Również inne dyscypliny badawcze szeroko rozumianego przyrodoznawstwa, a także spoza nauk biologicznych, dostarczają istotnych informacji przydatnych we wnioskowaniu na polu filogeografii. Są to między innymi: geologia, klimatologia i geografia historyczna. Filogeografia jest więc nauką interdyscyplinarną (Ryc. 2), a stanowiąc pomost między różnymi kierunkami zajmującymi się badaniem ewolucji w skali mikro i makro, należy we współczesnej biologii do grupy nauk o największym potencjale badawczym.

GENOM CHLOROPLASTOWY W BADANIACH FILOGEOGRAFICZNYCH

W celu uzyskania drzewa genealogicznego genów, pozwalającego na dalsze dociekania filogeograficzne, należy najpierw dokonać wyboru odpowiedniej dla celów analizy części genomu i odpowiedniej sekwencji. W przypadku filogeografii roślin sekwencje chloroplastowego DNA (cpDNA) należą do najpowszechniej wykorzystywanych. Dzieje się tak z kilku powodów:

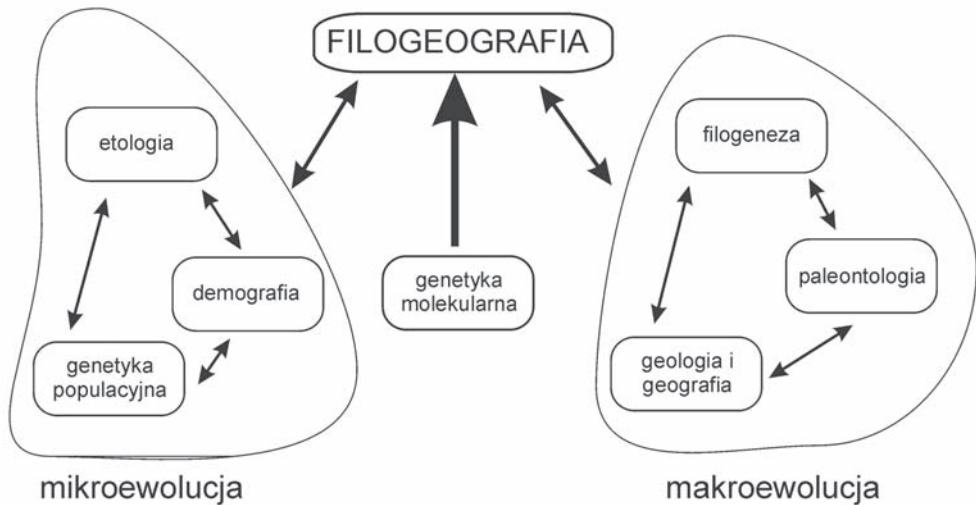
- cpDNA jest haploidalny i dziedziczny się głównie w linii matczynej (matrylinearnie) (Birky 1995). Jest więc pod tym względem odpowiednikiem mitochondrialnego DNA stosowanego szeroko w filogeografii zwierząt (Avise et al. 1987, Avise 2000);

- cpDNA jest cząsteczką nierekombinującą. Z tego powodu wszystkie geny zawarte w jednej cząsteczce dzielą wspólną historię ewolucyjną (Clegg, Żurawski 1992). Taka właściwość ułatwia dociekania dotyczące genealogii genów w tej cząsteczce i pozwala na to, by niezależnie od lokalizacji, wszystkie allele obserwowane



Ryc. 1. Hipotetyczna genealogia genów dla gatunku wykazującego ograniczony przepływ genów pomiędzy dwoma (geograficznie oddzielnymi) populacjami regionalnymi. Przestrzeń zacieniona na zielono oznacza geograficzny zasięg poszczególnych linii rodowych. Strzałki w obrębie najwyższego poziomu drzewa opisują kierunki i szybkość współczesnych migracji (według Avise 2000, zmodyfikowane).

Fig. 1. Hypothetical gene genealogy of a species showing restricted gene flow between two geographically isolated local populations. Shaded space represents geographical distribution of particular lineages. Arrows show directions and pace of contemporary migrations within present-day conspecific populations (according to Avise 2000, modified).



Ryc. 2. Filogeografia jako dyscyplina nauk biologicznych łącząca pola naukowe zajmujące się mikro- i makroewolucją (według Avise 2000, zmodyfikowane).

Fig. 2. Phylogeography as a field of research within biological sciences that incorporates data from different well-established disciplines (according to Avise 2000, modified).

w obrębie badanych *loci* mogły być zestawione w jeden haplotyp (chlorotyp) i analizowane wspólnie;

- genom chloroplastowy jest stosunkowo mały (ok. 150 kbp²), występuje w wielu kopiach w każdej komórce roślinnej i został w całości zsekwencjonowany tak dla roślin niższych, np. eugleny (Hallik et al. 1993) i porostnicy (Ohayama et al. 1986), jak i dla roślin wyższych: nagonasiennych – np. sosny (*Pinus thunbergii*) (Wakasugi et al. 1994), dwuliściennych – np. tytoń (Shinozaki et al. 1986) oraz jednoliściennych – np. ryż (Hiratsuka et al. 1989);

- z badań nad genomami chloroplastowymi wynika, że są one stabilne zarówno co do liczby kodowanych przez nie genów, jak i co do ich strukturalnej organizacji (Palmer 1985);

- tempo mutacji cpDNA umożliwia wykrycie polimorfizmu wewnątrzgatunkowego, który jest podstawą badań filogeograficznych (Soltis et al. 1992);

- dzięki stabilności struktury genomu chloroplastowego i konserwatywnemu charakterowi obszarów kodujących możliwe stało się zaprojektowanie starterów (ang. *consensus primers*) umożliwiających amplifikację zmiennych obszarów niekodujących będących głównym przedmiotem zainteresowania filogeografów (Demesure et al. 1995, Dumolin-Lapegue et al. 1997). Startery te są uniwersalne i pozwalają na uzyskanie regionów niekodujących z próbek DNA pochodzących od odległych pod względem filogenetycznym roślin: od paprotników, przez nagozależkowe do dwu- i jednoliściennych (Dumolin-Lapegue et al. 1997, Grivet 2002).

Pomimo tego, iż filogeografia zwierząt bazuje głównie na genomie mitochondrialnym (mtDNA), jego użycie w filogeografii roślin jest mocno utrudnione. Mitochondrialne DNA (mtDNA) roślin ma co prawda wiele wspólnych cech z cpDNA, które potencjalnie czyniłyby je idealnym obiektem badań (patrz wyżej), lecz z drugiej strony wykazuje ono olbrzymie zróżnicowanie pod względem wielkości i struktury

(Palmer 1992). Z tego też powodu jego użycie w badaniach nad filogeografią roślin jest mocno ograniczone (Palmer 1992, Clegg et al. 1994). Podsumowanie różnic, istotnych z punktu widzenia filogeografii, pomiędzy cpDNA a mtDNA u roślin i zwierząt przedstawiono w Tab. 1.

Stosowanie w badaniach filogeograficznych pozajądrowego DNA ma jednak swoje ograniczenia. Niektórzy badacze wysuwają bowiem szereg wątpliwości związanych ze używaniem mtDNA i cpDNA w rekonstrukcji historii ewolucyjnej na poziomie wewnątrzgatunkowym (Freeland 2005). Do najczęściej podnoszonych zarzutów należą między innymi:

- fakt, że cząsteczki mtDNA i cpDNA można w zasadzie traktować jako odpowiednik jednego *locus* jądrowego. Odtworzenie historii ewolucyjnej na podstawie jednego tylko *locus* może być jednak dalekie od rzeczywistości;

- informacja płynąca z obu rodzajów pozajądrowego DNA może być myląca, jeśli genom mitochondrialny lub chloroplastowy został przekazany między gatunkami w procesie hybrydyzacji (często połączonej z introgresją³);

- pozajądrowe DNA jest niezwykle podatne na „efekt szyjki butelki” (ang. *bottleneck effect*), co utrudnia niekiedy wnioskowanie (interpretację wyników);

- w przypadkach, kiedy osobniki żeńskie i męskie wykazują odmienne wzorce migracji (co w niewielkim stopniu dotyczy roślin), rekonstrukcja historii populacji oparta tylko o genom pozajądrowy dziedziczony matrylinearnie może być niekompletna.

Sposobem na uniknięcie wymienionych niedogodności jest umiejętne połączenie informacji płynącej z analizy zmienności cpDNA i mtDNA z informacjami uzyskanymi z analiz *loci* jądrowych (na przykład szczególnie do tego celu przydatnych *loci* mikrosatelitarnych). Dzieje się tak w przeważającej części współcześnie prowadzonych badań filogeograficznych.

² kbp – (ang. *kilo-base pair*) jednostka długości DNA lub RNA używana w genetyce i równa 1000 nukleotydów.

³ Introgresja – proces polegający na przeniesieniu genów z jednego gatunku do drugiego, który dochodzi do skutku poprzez wielokrotne krzyżowanie mieszańców międzygatunkowych z osobnikami jednego z gatunków rodzicielskich.

Tabela 1. Porównanie cech mtDNA i cpDNA kluczowych z punktu widzenia filogeografii.

Table 1. Comparison of the key features of mtDNA and cpDNA from the phylogeographic point of view.

Cecha <i>Feature</i>	mtDNA		cpDNA
	zwierzęta <i>animals</i>	rośliny <i>plants</i>	
Dziedziczenie <i>Descent system</i>	matrylinearne <i>matrilineal</i>	zmiennie <i>variable</i>	matrylinearne <i>matrilineal</i>
Wielkość cząsteczki [kbp] <i>Molecule length [kbp]</i>	12–17	200–2500	120–217
Rekombinacja <i>Recombination</i>	nie <i>no</i>	tak <i>yes</i>	nie <i>no</i>
Rearanżacja kolejności genów <i>Gene order rearrangement rate</i>	powolna <i>slow</i>	szybka <i>fast</i>	powolna <i>slow</i>
Tempo ewolucji sekwencji <i>Sequence evolution rate</i>	wysokie <i>high</i>	bardzo niskie <i>very low</i>	niskie <i>low</i>

STRUKTURA FILOGEOGRAFICZNA

Fakt istnienia zróżnicowania populacji w obrębie jednego gatunku jest znany nauce od dawna. Zwykle podkreślana jest rola doboru naturalnego jako głównego czynnika kształtującego genetyczną tożsamość zarówno gatunku, jak i populacji w jego obrębie. Istnieje na ten temat bogata literatura. Na licznych przykładach ukazano, jak zróżnicowane warunki środowiska były w stanie wygenerować zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe (Endler 1977, Endler 1986, Bell 1997).

Dziś wiemy jednak, że nie tylko dobór naturalny jest odpowiedzialny za obserwowane współcześnie wzory geograficzne zmienności i zróżnicowania gatunków. Obserwowana strukturyzacja może być także efektem zdarzeń historycznych, które w znaczącym stopniu mogą kształtować geograficzne wzorce zróżnicowania genetycznego na zasięgu geograficznym każdego z gatunków (Avise et al. 1987). W populacjach, które z przyczyn historycznych zostały podzielone oraz tam, gdzie przepływ genów został przez te same historyczne czynniki mocno ograniczony lub w ogóle uniemożliwiony, dywergencja ewolucyjna postępuje w sposób nieodwracalny, tak w przypadku genów adaptacyjnych, mających wpływ na stopień dostosowania organizmów do środowiska, jak i w przypadku *loci* neutralnych

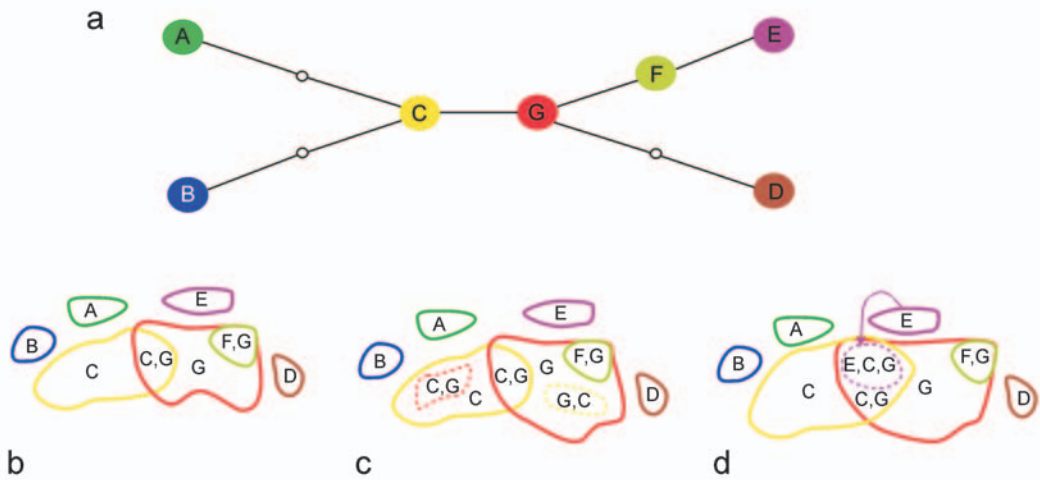
(Schaal et al. 1998, Avise 2000). Powstaje w ten sposób specyficzna struktura genetyczna, pozwalająca uchwycić określony stopień zróżnicowania pomiędzy populacjami osobników w obrębie tego samego gatunku. Strukturę taką nazwać możemy strukturą filogeograficzną, a natężenie i wzór przepływu genów w jej obrębie, jak i uwarunkowania historyczne, uznać możemy za najważniejsze czynniki kształtujące tę strukturę (Schaal et al. 1998).

Badania filogeograficzne polegają na uchwyceniu (identyfikacji), opisie oraz interpretacji przestrzennych wzorców rozmieszczenia haplotypów, których filogenetyczne zależności są znane. W ten sposób ocenić można, na ile wzór przestrzennego rozmieszczenia haplotypów pozostaje w zgodzie z ich związkami genealogicznymi. Na Ryc. 3 przedstawiono kilka przykładowych sytuacji, na których zobrazowane zostały różne relacje pomiędzy genealogią haplotypów, a ich geograficznym rozmieszczeniem.

Pierwszą z tych zależności jest wzór zgodności pomiędzy genealogią genów, a przestrzennym wzorcem ich rozmieszczenia (Ryc. 3b). Widać wyraźnie, że blisko spokrewnione haplotypy mają ściśle określone zasięgi geograficzne i pojawiają się w bezpośredniej przestrzennej bliskości. Ten układ wskazuje na silne ograniczenie przepływu genów pomiędzy

badanymi populacjami, które trwa już od dłuższego czasu. Widzimy, że w tym przypadku nowopowstałe mutacje pozostają zlokalizowane blisko miejsc swego powstania (Neigel et al. 1991, Slatkin 1991, Slatkin 1993, Templeton et al. 1995). W efekcie haplotypy najstarsze (rodzicielskie), lokujące się w centrum drzewa pokrewieństw, powinny być geograficznie najsilniej rozprzestrzenione, podczas gdy haplotypy najmłodsze (potomne), lokujące się na końcach

gałęzi drzewa pokrewieństw, mają najbardziej ograniczone rozmieszczenie geograficzne (Golding 1987, Castelleo, Templeton 1994, Templeton et al. 1995). Odstępstwa od tego schematu mogą pojawiać się w dwóch przypadkach: jeśli polimorfizm z populacji rodzicielskich przetrwa w populacjach potomnych (Ryc. 3c) lub jeśli pomiędzy analizowanymi populacjami pojawi się przepływ genów (Ryc. 3d).



Ryc. 3. Hipotetyczne drzewo najkrótszych połączeń obrazujące pokrewieństwa między haplotypami i przykłady geograficznego rozmieszczenia w przypadku różnych historii filogeograficznych badanego gatunku. a – drzewo najkrótszych połączeń haplotypów A–G. Linia łącząca poszczególne haplotypy jest równoznaczna z jednym zdarzeniem mutacyjnym. Wewnętrzne węzły drzewa (C, G) obrazują haplotypy ancestralne, podczas gdy na zakończeniach drzewa znajdują się młodsze haplotypy potomne (A, B, E, D). b – sytuacja spójności pomiędzy pokrewieństwem haplotypów a ich geograficznym rozmieszczeniem pojawiająca się zwykle w sytuacji ograniczonego przepływu genów między populacjami. Haplotypy ancestralne mają szeroki zasięg geograficzny, podczas gdy haplotypy potomne ograniczają się do izolowanych „wysp” w obrębie zasięgu gatunku. c – sytuacja niespójności pomiędzy pokrewieństwem haplotypów a ich geograficznym rozmieszczeniem spodziewana w przypadku przetrwania ancestralnego polimorfizmu (haplotypy C, G) w kilku miejscach zasięgu. d – sytuacja niespójności pomiędzy pokrewieństwem haplotypów a ich geograficznym rozmieszczeniem spodziewana w przypadku istnienia przepływu genów pomiędzy populacjami. Haplotype E obecny jest w populacji z haplotypami ancestralnymi. (według Schaal et al. 1998, zmodyfikowane).

Fig. 3. Hypothetical minimum spanning tree showing phylogenetic relationships between haplotypes and different phylogeographical scenarios. a – minimum spanning tree for haplotypes A–G. Line between haplotypes represents one mutation event. Internal nodes of the tree represents ancestral haplotypes (C, G), while external nodes represent younger, progeny haplotypes. b – concordance between haplotype tree and geographical distribution. This pattern occurs when gene flow between conspecific populations is restricted. Ancestral haplotypes have a broad geographical distribution while haplotypes located in external nodes of the tree are limited to isolated ‘islands’ within the range of the species. c – discordance between haplotype tree and geographical distribution is expected when ancestral genetic polymorphism persisted within species range (haplotypes C, G). d – discordance between haplotype tree and geographical distribution as expected in case of unrestricted gene flow between conspecific populations. Haplotype E is present in ancestral populations (according to Schaal et al. 1998, modified).

JAK ZIDENTYFIKOWAĆ STRUKTURĘ FILOGEOGRAFICZNĄ?

Jak już wspomniano, struktura filogeograficzna jest to struktura genetyczna wyrażająca się różnicowaniem pomiędzy populacjami osobników tego samego gatunku. Jej właściwy opis ma kluczowe znaczenie dla analiz filogeograficznych. Opisanie tej struktury za pomocą klasycznych współczynników mierzących genetyczne różnice pomiędzy populacjami jest niewystarczające; zbyt mało uwagi poświęca się w takim opisie odległościom filogenetycznym dzielącym poszczególne allele lub haplotypy stwierdzane w badanych populacjach. Używane współczynniki bazują często na różnicach we frekwencji alleli w badanych populacjach. Tymczasem właściwa droga do identyfikacji struktury filogeograficznej nie biegnie tędy. Aby ją wykryć, spytać należy także, a może przede wszystkim, o związki filogenetyczne pomiędzy allelami, których frekwencje w badanych populacjach określiliśmy podczas naszych badań. Żeby to osiągnąć, należy w obliczeniach klasycznych współczynników (patrz Dodatek) wprowadzić czynnik, który niósłby w sobie informację o filogenetycznych zależnościach pomiędzy populacjami. Taki skorygowany (i bardziej adekwatny) współczynnik, obliczony w oparciu o dane molekularne obejmujące frekwencję alleli oraz zależności filogenetyczne istniejące pomiędzy nimi, będzie miał wartość znacząco różną (wskazywał będzie na znacząco wyższy poziom zróżnicowania pomiędzy badanymi populacjami) niż współczynnik nie biorący pod uwagę zależności filogenetycznych (Pons, Petit 1996). Za pomocą takiego właśnie współczynnika (N_{ST}) jesteśmy w stanie określić istnienie (lub brak) zależności pomiędzy geograficznym rozmieszczeniem alleli (Ryc. 4), a związkami filogenetycznymi, które je łączą (Pons, Petit 1996). Zależność taka, to nic innego jak interesująca nas struktura filogeograficzna.

FILOGEOGRAFIA ROŚLIN EUROPEJSKICH

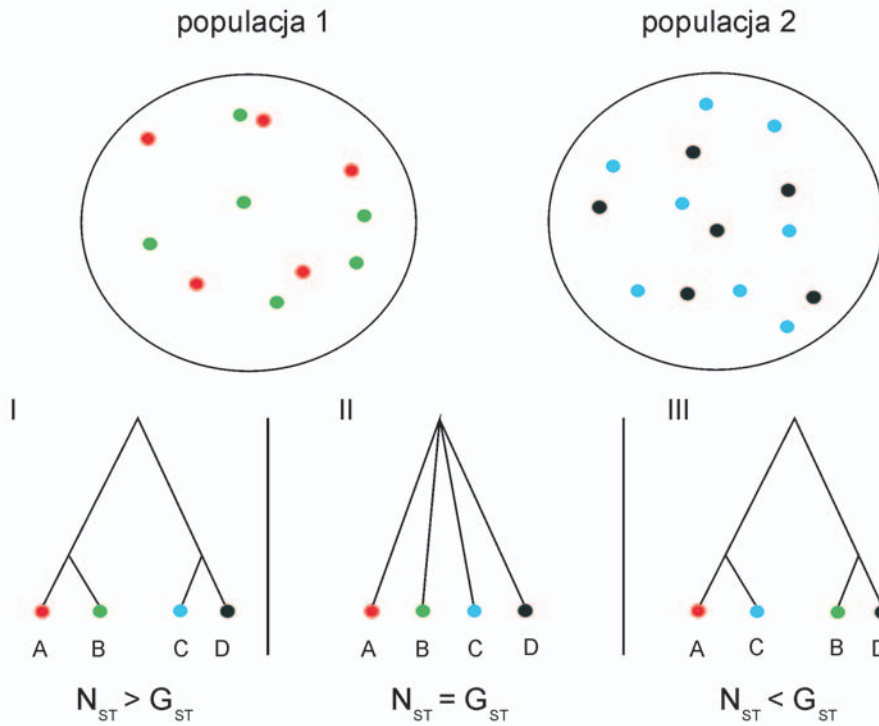
Po zapoznaniu się z podstawowymi zasadami i pojęciami filogeografii bliższej analizie poddać

trzeba ogólne cechy struktury filogeograficznej odkrywanej w czasie badań nad europejskimi gatunkami roślin. Należy także poznać czynniki mające największy wpływ na wzorce filogeograficzne powstałe na naszym kontynencie oraz zrozumieć, jak czynniki te kształtowały strukturę filogeograficzną roślin naczyniowych w Europie.

CZYNNIKI KSZTAŁTUJĄCE STRUKTURĘ FILOGEOGRAFICZNĄ W EUROPIE

Jak już powiedziano wcześniej, filogeografia to specyficzny sposób patrzenia na geny, który rozpatruje łącznie ich pokrewieństwo oraz rozmieszczenie geograficzne, a także czynniki historyczne kształtujące różnorakie relacje pomiędzy nimi. Wpływ tych czynników na strukturę filogeograficzną roślin zależy od siły ich działania, ale także od czasu w jakim oddziałują na populacje badanych organizmów (Avise 2000). Biorąc to pod uwagę, do najważniejszych czynników kształtujących strukturę filogeograficzną roślin w Europie zaliczyć można: występowanie naturalnych barier dla wędrówek gatunków i przepływu genów (łańcuchy górskie, morza) oraz oddziaływanie warunków środowiska wywołane cyklicznymi zmianami klimatu w czwartorzędzie. Szczególnie ten drugi czynnik, zdolny wywołać znaczące zmiany w środowisku naturalnym organizmów, zasługuje na naszą uwagę w aspekcie sił kształtujących strukturę filogeograficzną gatunków zamieszkujących kontynent europejski.

Wiadomo dzisiaj, że klimat w okresie czwartorzędzie (najmłodszym okresie ery kenozoicznej, który rozpoczął się ponad 2 mln lat temu) podlegał znaczącym wahaniom polegającym na naprzemiennym występowaniu globalnych ociepleń i oziębień. Trafnie ujął to Brett i współautorzy (Brett et al. 1996), który w swojej pracy nazwali ten okres czasem „kryzysu i przebudowy”. Szacuje się, że proces poważnego ochłodzenia klimatu i rozwoju wielkich zlodowaceń na półkuli północnej rozpoczął się około 2,75 mln lat temu (Maslin et al. 1996, Jansen et al. 2000) i przez większość czwartorzędzie podlegał



Ryc. 4. Przykłady występowania zgodności i niezgodności pomiędzy pokrewieństwem haplotypów, a ich geograficznym rozmieszczeniem. W przypadku występowania zgodności (I), zróżnicowanie między populacjami, mierzone z użyciem współczynnika zaproponowanego przez Pons i Petit (1996) – N_{ST} , jest większe niż mierzone współczynnikiem bazującym tylko na frekwencji haplotypów – G_{ST} . W przypadku kiedy haplotypy są jednakowo spokrewnione ze sobą, współczynniki nie różnią się znacząco od siebie (II). Kiedy najbliższe spokrewnione ze sobą haplotypy nie pojawiają się nigdy w tych samych populacjach (III), współczynnik N_{ST} jest znacząco niższy niż G_{ST} (według Pons, Petit 1996, zmodyfikowane).

Fig. 4. Examples of concordance and discordance between haplotype phylogeny and geographical distribution. In case of concordance (I) the genetic differentiation between analyzed populations measured with N_{ST} – an index proposed by Pons and Petit (1996) and taking into account similarities between haplotypes – is greater than the differentiation based only on the sole frequency of haplotypes – G_{ST} . When analyzed haplotypes are equally related values of both indices do not differ significantly (II). When the most related haplotypes are never found together in conspecific populations (III) value of G_{ST} is significantly higher than N_{ST} (according to Pons, Petit 1996, modified).

wahaniom wywołanym przez zmiany w nasłonecznieniu naszej planety (Hays et al. 1976, Imbrie, Imbrie 1979). Badania wskazują, że zimne, niekorzystne warunki związane z okresami glacjałów panowały na półkuli północnej przez około 80% czasu trwania czwartorzędu. Pozostałe 20% stanowiły okresy ocieplenia (zwane interglacjałami), w których umiarkowany klimat europejski był niekiedy cieplejszy niż obecnie (Frogley et al. 1999).

Globalne ochłodzenie klimatu przypadające na początek czwartorzędu skutkujące zajęciem

większości obszarów lądowych Europy położonych w wysokich i średnich szerokościach geograficznych przez lądolody, spowodowało znaczące zmiany w rozmieszczeniu gatunków roślin (Willis, Niklas 2004). Większość z nich, z powodu silnego obniżenia się temperatury (szacuje się, że w najzimniejszych okresach mogła być ona niższa o 10 do 25°C niż obecnie) (Peltier 1994, Pollard, Thompson 1997) albo wyginęła albo wycofała się na południe, zajmując bardzo ograniczone obszary zwane refugiami, gdzie bardziej korzystne warunki

klimatyczne pozwalały im na przetrwanie kolejnych glacjałów (Willis 1996, Willis, Niklas 2004). Obecnie uważa się, że najważniejsze refugia znajdowały się na trzech półwyspach południowo-europejskich: Półwyspie Bałkańskim, Półwyspie Apenińskim i Iberyjskim (Willis, McElwain 2002). Z roku na rok przybywa także przesłanek pozwalających przypuszczać, że rośliny zaadaptowane do surowszych warunków klimatycznych, do których należy większość roślin górskich, przetrwała zlodowacenie w tak zwanych „refugiach północnych” (ang. *northern refugia*), położonych w wyższych szerokościach geograficznych na północ od Alp (Stewart, Lister 2001).

W okresach ocieplenia, jak również po zupełnym ustąpieniu lodowców, następowała rekolonizacja obszarów położonych na północ od regionów refugium. Ocenia się, że proces ten przebiegał dość gwałtownie, a w niektórych przypadkach mógł nawet osiągać prędkość kilkuset metrów rocznie (Brewer et al. 2002).

Należy zauważyć, że wiedza na temat wpływu wyżej wymienionych czynników na kształtowanie się współczesnych wzorców fitogeograficznych całej północnej półkuli jest już od dawna dobrze ukształtowana (por. np. Kornaś, Medwecka-Kornaś 2002). Na podstawie wieloletnich obserwacji sformułowano bowiem szereg hipotez dotyczących losów flory europejskiej w tym szlaków jej postglacialnej migracji, czy lokalizacji refugium. Poznanie bardziej subtelnej (często regionalnej) struktury fitogeograficznej oraz związane z tym możliwości pozwalające na weryfikację hipotez dotychczas nieweryfikowalnych lub trudnych do zweryfikowania na podstawie tradycyjnych metod badawczych, to istotne *novum*, jakie podejście filogeograficzne wnosi do fitogeografii.

OGÓLNE CECHY STRUKTURY FILOGEOGRAFICZNEJ EUROPEJSKICH GATUNKÓW ROŚLIN

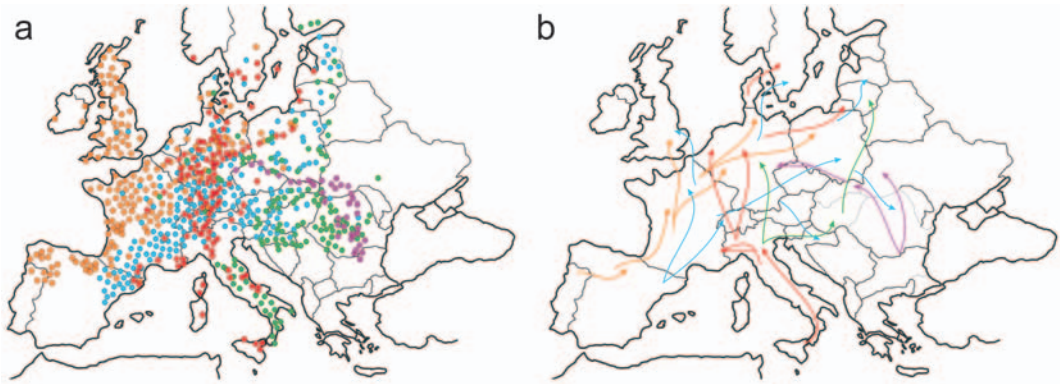
Jeszcze niedawno wielu badaczy uważało okres zlodowaceń za czas ewolucyjnej stagnacji i procesów wymierania będących odpowiedzią

na fragmentację siedlisk, a nierzadko ich zupełne zniszczenie podczas czwartorzędu (Bennett 1990). Pogląd ten jednak uległ pewnej modyfikacji. Obecnie uważa się, że niezależnie od zniszczeń starej flory trzeciorzędowej, jakie miały miejsce podczas czwartorzędu, okres ten był także czasem genetycznej dywersyfikacji oraz nasilenia procesów specjacji (Jackson 2000).

Zmiany spowodowane fluktuacjami klimatu i kolejnymi zlodowaceniami, wycisnęły swoje piętno nie tylko na składzie gatunkowym flory europejskiej, ale także, a może nawet przede wszystkim, na strukturze filogeograficznej odkrywanej obecnie przez wielu badaczy. Strukturę tę opisać można na pewnym ogólnym poziomie za pomocą trzech głównych cech, którymi są: (1) występowanie w Europie bardzo silnej struktury w różnorodności genetycznej organizmów żywych (w tym roślin) (Ryc. 5a), (2) częste występowanie południkowego wzoru rozmieszczenia różnych linii rodowych (haplotypów) (Ryc. 5a), (3) występowanie większości środkowo- i północnoeuropejskich haplotypów (linii rodowych) na jednym lub kilku obszarach położonych w obrębie półwyspów południowo-europejskich (Ryc. 5a).

Prawidłowości te są wynikiem procesów, do jakich doszło podczas epok lodowych: przede wszystkim fragmentacji zasięgów, ograniczenia przepływu genów pomiędzy różnymi izolowanymi populacjami tego samego gatunku, który znalazł miejsce swego przetrwania często w kilku różnych refugiach. Tym samym powstała sytuacja sprzyjająca ewolucji odrębnych linii rodowych w różnych, oddzielonych od siebie barierami, regionach geograficznych. Fragmentacja zasięgu pozwoliła na powstawanie nowych linii rodowych w obrębie jednego gatunku i kształtowania się specyficznej struktury filogeograficznej (Avisé et al. 1987).

Podczas rekolonizacji obszarów opuszczonych przez lądolód, następowała migracja osobników z różnych linii rodowych w kierunku północnym (Ryc. 5b). Migracji tej towarzyszyło często powstawanie gradientu różnorodności



Ryc. 5. Struktura filogeograficzna hipotetycznego gatunku rośliny występującej w Europie. a – mapa geograficznego rozmieszczenia haplotypów: gatunek przetrwał okres zlodowaceń w trzech refugiach zlokalizowanych na półwyspach Iberyjskim, Apenińskim i Bałkańskim; widoczne są inne cechy typowe dla struktury filogeograficznej gatunków europejskich, jak występowanie wyraźnej struktury genetycznej różnorodności wewnątrz gatunku, południkowe rozmieszczenie linii haplotypów oraz występowanie haplotypów obecnych w centralnej części kontynentu w trzech różnych obszarach półwyspów południowoeuropejskich. b – rekonstrukcja dróg migracji roślin i procesu rekolonizacji Europy po ustąpieniu lądolodu przeprowadzona na podstawie danych o rozmieszczeniu haplotypów – obecnie linie rodowe, które wyewoluowały w różnych refugiach, kontaktują się ze sobą w licznych strefach wtórnego kontaktu (rycina na podstawie danych z pracy Petit et al. 2002, gruntownie zmodyfikowana).

Fig. 5. Phylogeographic structure of a hypothetical plant species occurring in Europe. a – map of a geographical distribution of haplotypes: species survived the ice age in three refugia located in Iberian, Italian and Balkan Peninsulas; other features typical for phylogeographic structure in European plant species are visible such as the presence of a clear genetic structure within species range, longitudinal pattern of the geographical distribution of haplotypes and the occurrence of haplotypes present in the central part of the continent in three different areas in southern Europe. b – reconstruction of the plant migration routes and the process of recolonization of the Europe after the last glacial maximum made on the basis of geographical distribution of haplotypes. The zones of secondary contact between different lineages originating from different southern refugia are visible. The figure was prepared on the basis of the data from Petit et al. (2002).

genetycznej biegnącego z południa na północ Europy (Hewitt 1996). W miarę upływu czasu w populacjach potomnych, powstających na północ od obszarów refugialnych, powstawały nowe haplotypy. Dzięki temu dziś, badając rozmieszczenie geograficzne haplotypów oraz ich filogenetyczne pokrewieństwo, jesteśmy w stanie zidentyfikować obszary refugiów, prześledzić trasy migracji roślin oraz wskazać miejsca, w których doszło do wtórnego kontaktu pomiędzy liniami rodowymi ewoluującymi w różnych refugiach (Petit et al. 2003). Ciekawe, że to właśnie te miejsca wtórnego kontaktu (strefy mieszańcowe), a nie, jak można by się tego spodziewać refugia, są obecnie obszarami o najwyższej różnorodności genetycznej i swoistymi „tyglami” bioróżnorodności (Petit et al. 2003).

PODSUMOWANIE

Filogeografia, jako kierunek ewolucyjnej biogeografii, jest drogą „poznania zasad i procesów rządzących geograficznym rozmieszczeniem linii rodowych, a w szczególności tych w obrębie jednego gatunku lub wśród blisko spokrewnionych gatunków”. Ta interdyscyplinarna dziedzina biologii, stanowiąca przestrzeń kontaktu pomiędzy różnymi dyscyplinami nauk biologicznych zajmujących się ewolucją w skali mikro i makro, stara się rozpatrywać równocześnie kilka aspektów zmienności i genetycznego zróżnicowania: pokrewieństwo pomiędzy genami, ich geograficzne rozmieszczenie oraz czas dywergencji linii rodowych. Badania filogeograficzne polegają głównie na interpretacji przestrzennych wzorców rozmieszczenia

haplotypów, których filogenetyczne zależności są znane. Badania te dążą do poznania struktury filogeograficznej analizowanych gatunków, a poprzez nią do testowania hipotez dotyczących stosunków pokrewieństwa między genami w kontekście geograficznym oraz w kontekście czynników i procesów kształtujących wspomnianą strukturę genetyczną. W badaniach filogeograficznych na roślinach wykorzystuje się głównie cząsteczki chloroplastowego DNA, które pozwalają na stosunkowo łatwe i wydajne odtwarzanie najnowszej historii ewolucyjnej gatunków. Niektórzy badacze podnoszą zarzuty związane z wykorzystaniem cząsteczek cpDNA w badaniach filogeograficznych, jednakże umiejętne połączenie informacji płynącej z analizy zmienności cpDNA z informacją pochodzącą z analizy *loci* jądrowych pozwala w większości przypadków na wiarygodną rekonstrukcję przestrzenno-filogenetycznej historii badanych gatunków.

Struktura filogeograficzna roślin europejskich kształtowała się głównie pod wpływem fluktuacji klimatu, które trwały przez cały plejstocen i doprowadziły do znaczących zmian we florze Europy, biogeograficznych wzorcach rozmieszczenia roślin oraz różnorodności genetycznej w obrębie każdego z gatunków. Fragmentacja zasięgów, połączona z długotrwałą izolacją umożliwiła ewolucję różnych linii rodowych w różnych regionach geograficznych, a to z kolei doprowadziło do powstania struktury filogeograficznej obecnej u większości europejskich gatunków roślin. Struktura ta cechuje się między innymi południkowym rozmieszczeniem osobników z różnych linii rodowych (haplotypów) oraz gradientem różnorodności genetycznej biegnącym z południa na północ kontynentu. Po ustąpieniu lądolodu szybka rekolonizacja obszarów uwolnionych spod mas śniegu i lodu doprowadziła do powstawania populacji potomnych, położonych na północ od obszarów refugium. Śledząc zależności filogenetyczne pomiędzy haplotypami oraz ich współczesne rozmieszczenie geograficzne, jesteśmy w stanie odtworzyć czwartorzędową historię wielu gatunków roślin.

LITERATURA

- AVISE J. C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts and London.
- AVISE J. C., ARNOLD J., BALL R. M. J., BIRMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J. E., REEB C. A., SAUNDERS N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489–522.
- BELL G. 1997. Selection: the mechanism of evolution. Chapman and Hall, New York.
- BENNETT K. D. 1990. Milankovitch cycles and their effects on species in ecological and evolutionary time. *Paleobiology* **16**: 11–21.
- BIRKY C. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 11331–11338.
- BRETT C. E., IVANY L. C., SCHOPF K. M. 1996. Coordinated stasis: an overview. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **127**: 1–20.
- BREWER S., CHEDDADI R., DE BEAULIEU J. L., REILLE M. 2002. The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management* **156**: 27–48.
- CASTELLOE J., TEMPLETON A. R. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molec. Phylogenet. Evol.* **3**: 102–113.
- CLEGG M. T., GAUT B. S., LEARN G. H., MORTON B. R. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 6795–6801.
- CLEGG M. T., ŻURAWSKI G. 1992. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. W: P. S. SOLTIS, D. E. SOLTIS, J. J. DOYLE (red.), *Molecular systematics of plants*. Chapman and Hall, New York, s. 1–13.
- DEMASURE B., SODZI N., PETIT R. J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* **4**: 129–131.
- DUMOLIN-LAPÈGUE S., PEMONGE M. H., PETIT R. J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology* **6**: 393–397.
- ENDLER J. A. 1977. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton.
- ENDLER J. A. 1986. Natural selection in the wild. Princeton University Press, Princeton.
- FREELAND J. R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- FROGLEY M. R., TZEDAKIS P. C., HEATON T. H. E. 1999.

- Climatic variability in northwest Greece during the last interglacial. *Science* **285**: 1886–1889.
- GOLDING G. B. 1987. The detection of deleterious selection using ancestors inferred from a phylogenetic history. *Genetics Research* **49**(1): 71–82.
- GRIVET D. 2002. Phylogéographie et évolution moléculaire comparée d'arbres forestiers à l'aide des marqueurs chloroplastiques. PhD thesis, Université Henry Poincaré, Nancy-I.
- HALLIK R. B., HONG L., DRAGER R. G., FAVREAU M. R., MONFORT A., ORSAT B., SPIELMANN A., STUTZ E. 1993. Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research* **21**: 3537–3544.
- HAYS J. D., IMBRIE J., SHACKLETON N. J. 1976. Variation in the Earth's orbit: pacemaker of ice ages. *Science* **194**: 1121–1132.
- HEWITT G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* **58**: 247–276.
- HIRATSUKA J., SHIMADA H., WHITTIER R., ISHIBASHI T., SAKAMOTO M., MORI M., KONDO CH., CHONG-RONG S., BING-YUAN M., YU-QING L., KANNO A., NISHIZAWA Y., HIRAI A., SHINOZAKI K., SUGIURA M. 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Molecular and General Genetics* **217**: 185–194.
- IMBRIE J., IMBRIE K. P. 1979. Ice ages: solving the mystery. Macmillan, Londyn.
- JACKSON S. T. 2000. Out of the garden and into the cooler? A Quaternary perspective on deep-time paleoecology. W: R. A. GASTALDO, W. A. DiMICHELE (red.), Phanerozoic terrestrial ecosystems. Paleontological Society Papers, 6. The Paleontological Society, Iowa, s. 287–308.
- JANSEN E., FRONVAL T., RACK F., CHANNEL J. E. T. 2000. Pliocene-Pleistocene ice rafting history and cyclicity in the Nordic Seas during the last 3.5 Myr. *Paleoceanography* **15**: 709–721.
- KORNAŚ J., MEDWECKA-KORNAŚ A. 2002. Geografia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- MASLIN M. A., HAUG G. H., SARNTHEIN M., TIEDEMANN R. 1996. The progressive intensification of northern hemisphere glaciation as seen from the North Pacific. *Geologische Rundschau* **85**: 452–465.
- NEIGEL J. E., BALL R. M., AVISE J. C. 1991. Estimation of single generation mutation distances from geographic variation of animal mitochondrial DNA. *Evolution* **45**: 423–432.
- OHAYAMA K., FUKUZAWA H., KOHCHI T., SHIRAI H., SANO T., SANO S., UMESONO K., SHIKI Y., TAKEUCHI M., CHANG Z., AOTA S., INOKUCHI H., OZEKI H. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* **322**: 572–574.
- PALMER J. D. 1985. Comparative organization of chloroplast genomes. *Annual Rev. Genet.* **19**: 325–254.
- PALMER J. D. 1992. Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. W: P. S. SOLTIS, D. E. SOLTIS, J. J. DOYLE (red.), Molecular systematics of plants, Chapman and Hall, New York, s. 36–49.
- PELTIER W. R. 1994. Ice age paleotopography. *Science* **265**: 195–201.
- PETIT R. J., AGUINAGALDE I., DE BEAULIEU J. L., BITTKAU CH., BREWER S., CHEDDADI R., ENNOS R., FINESCHI S., GRIVET D., LASCoux M., MOHANTY A., MULLER-STARCK G., DEMESURE-MUSCH B., PALME A., MARTIN J. P., RENDELL S., VENDRAMIN G. G. 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* **300**: 1563–1565.
- PETIT R. J., CSAIKL U. M., BORDÁCS S., BURG K., COART E., COTTRELL J., VAN DAM B., DEANS J. D., DUMOLIN-LAPÉGUE S., FINESCHI S., FINKELDEY R., GILLIES A., GLAZ I., GOICOECHEA P. G., JENSEN J. S., KÖNIG A. O., LOWE A. J., MADSEN S. F., MÁTYÁS G., MUNRO R. C., OLALDE M., PEMONGE M. H., POPESCU F., SLADE D., TABBENER H., TAURICHINI D., DE VIRE S. G. M., ZIEGENHAGEN B., KREMER A. 2002. Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* **156**: 5–26.
- POLLARD D., THOMPSON S. L. 1997. Climate and ice-sheet mass balance at last glacial maximum from the Genesis v2 global climate model. *Quaternary Science Reviews* **16**: 841–864.
- PONS O., PETIT R. J. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. I. Haploid locus. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 462–470.
- PONS O., PETIT R. J. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* **144**: 1237–1245.
- SCHAAL B. A., HAYWORTH D. A., OLSEN K. M., RAUSCHER J. T., SMITH W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* **7**: 465–474.
- SHINOZAKI K., OHME M., TANAKA M., WAKASUGI T., HAYASHIDA N., MATSUBAYASHI T., ZAITA N., CHUNWONGSE J., OBOKATA J., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., OHTO C., TORAZAWA K., MENG B. Y., SUGITA M., DENO H., KAMOGASHIRA T., YAMADA K., KUSUDA J., TAKAIWA F., KATO A., TOHDON N., SHIMADA H., SUGIURA M. 1986. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *The EMBO Journal* **5**: 2043–2049.
- SLATKIN M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescent times. *Genetics Research* **58**: 167–175.

- SLATKIN M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* **47**: 264–279.
- SOLTIS D. E., SOLTIS P. S., MILLIGAN B. G. 1992. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. W: P. S. SOLTIS, D. E. SOLTIS, J. J. DOYLE (red.), *Molecular systematics of plants*. Chapman and Hall, New York, s. 117–150.
- STEWART J. R., LISTER A. M. 2001. Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends Ecol. Evol.* **16**: 608–613.
- TEMPLETON A. R., CRANDALL K.A., SING C. F. 1992. Separating populations structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**: 619–633.
- WAKASUGI T., TSUDZUKI J., ITO S., NAKASHIMA K., TSUDZUKI T., SUGIURA M. 1994. Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 9794–9798.
- WEIR B. S., COCKERHAM C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358–1370.
- WILLIS K. J. 1996. Where did all the flowers go? The fate of temperate European flora during glacial periods. *En-deavour* **20**: 110–114.
- WILLIS K. J., MCELWAIN J. C. 2002. *The evolution of plants*. Oxford University Press, Oxford – New York.
- WILLIS K. J., NIKLAS K. J. 2004. The role of Quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or the rule? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **359**: 159–172.

DODATEK

RÓŻNE PODEJŚCIA DO KWANTYFIKACJI GENETYCZNEJ STRUKTURY POPULACJI

F_{IS}: WSPÓŁCZYNNIK WSOBNOŚCI – określa stopień wsobności, czyli proporcję heterozygotyczności obserwowanej do oczekiwanej w obrębie populacji, losowość kojarzenia się osobników. Może przyjmować wartości od –1 do 1. Nieistotne wartości **F_{IS}** oraz **F_{IS}=0** oznaczają, że populacja pozostaje w równowadze *Hardy’ego Weinberga* i nie występuje w niej wewnętrznej struktura. Istotne statystycznie wartości **F_{IS} > 0** mogą wskazywać na: efekty wsobności (ang. *inbreeding*), istnienie struktury

wewnętrznej w populacji (występowanie subpopulacji), dryf genetyczny, istnienie doboru płciowego lub fizyczne sprzężenie *loci*, jako że w populacji występuje nadmiar homozygot. Wartości **F_{IS} < 0** mające potwierdzoną istotność statystyczną oznaczają, iż w populacji występuje nadmiar heterozygot, który może być wynikiem selekcji na heterozygoty albo efektu „szyjki od butelki” (ang. *bottleneck effect*).

$$F_S = \frac{H_E - H_O}{H_E},$$

gdzie: **H_O** – współczynnik heterozygotyczności obserwowanej,

H_E – współczynnik heterozygotyczności oczekiwanej

F_{ST}: WSPÓŁCZYNNIK UTRWALENIA – określa spadek heterozygotyczności w subpopulacji w stosunku do całej populacji na skutek np. selekcji lub dryfu genetycznego. Jego wartości wskazują, jak intensywny jest przepływ genów pomiędzy subpopulacjami. Może przyjmować wartości od 0 (brak różnicowania pomiędzy populacjami) do 1 (populacje zupełnie różne) (Weir, Cockerham 1984).

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_O}{H_T}$$

gdzie: **H_T** – współczynnik różnorodności genetycznej obliczony dla grupy populacji

H_O – współczynnik heterozygotyczności obserwowanej

G_{ST}: jest alternatywnym estymatorem **F_{ST}** bazującym na rozkładzie współczynników różnorodności zaproponowanym przez Pons i Petit (1995), gdzie wszystkie populacje mają tę samą wagę, niezależnie od wielkości próby.

N_{ST}: współczynnik porównywalny z **F_{ST}** lub **G_{ST}** zaprojektowany, aby umożliwić ocenę wpływu odległości filogenetycznych dzielących allele na zróżnicowanie pomiędzy populacjami (Pons, Petit 1996). Aby umożliwić zbadanie wpływu zależności filogenetycznych pomiędzy allelami na strukturę genetyczną, należy porównać ze sobą wartości **N_{ST}** i **G_{ST}** zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Pons i Petit (1996).