

# Różnorodność genetyczna tatrzańskiej populacji wilka *Canis lupus*

*Robert W. Mysłajek, Maciej Szewczyk, Tomasz Zwijacz-Kozica, Natalia Niedźwiecka, Jarosław Rabiasz, Gabriela Chovancová, Erika Feriancová, Michał Figura, Sabina Nowak*

**Abstrakt.** Wykorzystaliśmy 13 autosomalnych loci mikrosatelitarnych do oceny różnorodności genetycznej populacji wilka (*Canis lupus*) zamieszkującej Tatry wzdłuż granicy polsko-słowackiej. Z prób materiału biologicznego, zebranego w latach 2017-2018, zidentyfikowano genotypy 42 wilków. Wszystkie badane loci były polimorficzne, ze średnią liczbą alleli wynoszącą  $N_a = 5,077$  i różnorodnością alleliczną  $A_R = 4,771$ . Zbliżone wartości heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej ( $H_o = 0,652$ ,  $H_e = 0,656$ ) wskazały na brak odchylenia od równowagi Hardy'ego-Weinberga. Wartości współczynnika inbrodu sugerują, iż badana populacja nie jest zagrożona wystąpieniem chowu wsobnego.

**Słowa kluczowe:** genetyka konserwatorska, duże drapieżniki, populacje transgraniczne

**Abstract. Genetic diversity in wolf *Canis lupus* population in Tatra Mountains.** We used 13 autosomal microsatellite loci to evaluate the genetic diversity in the wolf (*Canis lupus*) population inhabiting Tatra Mountains along Polish-Slovak border. From samples of biological material collected in 2017-2018, we identified genotypes of 42 wolves. All studied loci were polymorphic, with mean number of alleles being  $N_a = 5.077$  and allelic richness  $A_R = 4.771$ . Similarity in both observed and expected heterozygosity ( $H_o = 0.652$ ,  $H_e = 0.656$ ) indicated no deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. The values of inbreeding coefficient suggest that the studied population is not at risk of inbreeding.

**Key words:** conservation genetics, large carnivores, transboundary populations

## Wstęp

Utrata różnorodności biologicznej jest uważana za jedno z największych zagrożeń dla funkcjonowania ekosystemów oraz dostarczania usług ekosystemowych (Butchard i in. 2010, Cardinale i in. 2012, Ceballos i in. 2017). Kluczowym poziomem różnorodności biologicznej jest różnorodność genetyczna, mająca przemożny wpływ na zdolność adaptacji organizmów do środowiska, w tym do zmian będących wynikiem działalności człowieka. Obniżenie różnorodności genetycznej, będąca np. konsekwencją antropogenicznego regresu liczebności populacji i następującego w jego wyniku inbrodu, może prowadzić do istotnej redukcji przystosowania organizmów i erozji procesów ewolucyjnych (Reed i Frankham 2003, Coates i in. 2018).

Aktywność człowieka, zwłaszcza związana z przekształcaniem naturalnych ekosystemów w obszary użytkowane rolniczo lub zurbanizowane oraz pozyskiwaniem dzikich zwierząt do celów łowieckich, doprowadziła do znacznego zubożenia fauny w skali globalnej (Allendorf i in. 2013, Newbold i in. 2015). W szczególnie dotkliwy sposób działalność ludzi dotknęła gatunki o większej masie ciała, wśród których znalazły się również duże ssaki drapieżne (Estes i in. 2011, Dirzo i in. 2014). Duże drapieżniki są gatunkami kluczowymi dla funkcjonowania ekosystemów (Ripple i in. 2014, Kuiper i in. 2013), a ich obecność ma istotne znaczenie dla dobrostanu ludzi (O'Bryan i in. 2018). Z tego względu przywracanie dużych drapieżników do środowiska uważane jest za ważne narzędzie wspomagające odtwarzanie naturalnych układów troficznych w ekosystemach (Svenning i in. 2016).

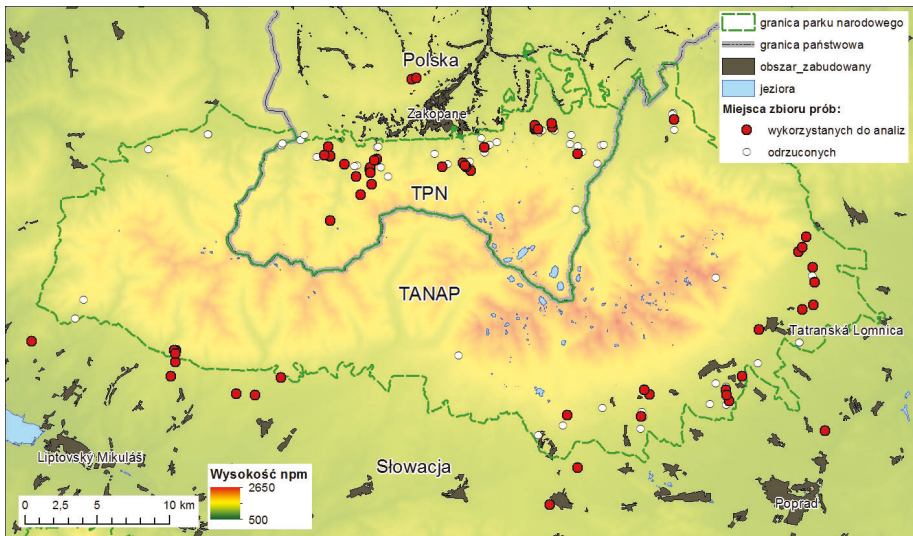
Dzięki wdrożeniu rozwiązań prawnych ograniczających polowania na duże drapieżniki, a także realizacji projektów pomagających ograniczać poziom konfliktów z gospodarką człowieka, w wielu regionach Europy udało się zatrzymać spadek populacji dużych ssaków drapieżnych (Chapron i in. 2014). Szczególnie spektakularny sukces odnotowano w przypadku wilka *Canis lupus*, który dzięki ochronie zrekolonizował rozległe fragmenty Półwyspu Skandynawskiego, Półwyspu Apenińskiego, północnej części Półwyspu Pirenejskiego, Alp oraz Nizin Środkowoeuropejskich (Chapron i in. 2014). W Polsce ścisła ochrona gatunkowa wilka poskutkowała odtworzeniem się jego populacji w regionach, w których został uprzednio wyteplony (Nowak i in. 2008, Nowak i Mysłajek 2016).

W krajach zachodniej i północnej Europy, w których wilki zostały w czasach historycznych niemal doszczętnie wyteplone, różnorodność genetyczna tych drapieżników dramatycznie spadła (Dufresnes i in. 2018). Co więcej proces rekolonizacji zachodził ze stosunkowo homogenicznych genetycznie populacji skutkując również niską różnorodnością genetyczną populacji odtwarzających się, co szczególnie mocno widoczne było na Półwyspie Skandynawskim (Åkesson i in. 2016). Nawet w populacjach liczniejszych, np. w Karpatach, skutki intensywnych odstrzałów widoczne są w wyraźnie zarysowanej strukturze genetycznej populacji (Hulva i in. 2018). Przykłady te wskazują na konieczność dokumentowania różnorodności genetycznej populacji na różnych etapach jej rozwoju, by uzyskać materiał do porównań w przypadku zmian wynikających np. ze zmian łączności siedlisk (Hamblen i Canney 2013).

Celem naszych badań była ocena podstawowych parametrów różnorodności genetycznej populacji wilka zamieszkującej Tatrę i Podtatrę, w tym położonych po obu stronach granicy polsko-słowackiej parków narodowych.

## Material i metody

Zbiór prób do badań genetycznych nad wilkami prowadzono w latach 2017-2018 roku zarówno po polskiej (Tatrzański Park Narodowy – TPN, Pasma Gubałowskie), jak i po słowackiej (Tatrzański národný park – TANAP, Kotlina Liptowska, Kotlina Popradzka) stronie Tatr (ryc. 1). Podczas całorocznych tropień, zebrano łącznie 141 prób materiału biologicznego (22 w roku 2017 i 119 w 2018), głównie odchodów, moczu i sierści, ale także tkanek pobranych od wilków zabitych na Słowacji (ryc. 1). Wilcze odchody oraz tkanki były przechowywane w plastikowych pojemnikach (50 ml) wypełnionych 96% alkoholem etylowym. Sierść znajdowana na legowiskach wilków przechowywana była w papierowych kopertach z dodatkiem żelu krzemionkowego w celu pochłaniania wilgoci. Mocz (15 ml) zbierano zimą ze śniegu do próbek typu Falcon zawierających 30 ml 96% etanolu i 1,5 ml 3 M octanu sodu.



**Ryc. 1.** Lokalizacja prób wykorzystanych w badaniach genetycznych wilków w Tatrach  
*Fig. 1.* Locations of samples used in study on the wolf genetic diversity in Tatra Mountains

W zależności od rodzaju materiału biologicznego DNA izolowano przy pomocy QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAamp Blood&Tissue Kit oraz QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen). Wszystkie procedury były wykonywane w wydzielonym laboratorium Instytutu Genetyki i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego przeznaczonym do przetwarzania materiału zebranego w sposób nieinwazyjny.

Wyizolowane DNA użyto jako matrycę do amplifikacji następujących 13 autosomalnych loci mikrosatelitarnego DNA, wykorzystywanych przez Central European Wolf Consortium do badań nad genetyką populacyjną wilka (de Groot i in. 2016): FH2001, FH2010, FH2017, FH2137, FH2087, FH2088, FH2096, FH2140, FH2054, FH2161 (Francisco i in. 1996), CPH5 (Fredholm i Winterø 1995), vWF (Shibuya i in. 1994) oraz PEZ17 (Neff i in. 1999). Do identyfikacji płci zamplifikowano fragment chromosomów DBX intron 6 oraz DBY intron 7. Szczegółowy opis przebiegu reakcji multiplex PCR można znaleźć w pracy Lesniak i in. (2017).

Produkty łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) analizowano w sekwenatorze ABI3130 DNA Analyzer (Life Technologies, Germany), a długość sekwencji określano za pomocą oprogramowania PeakScanner (Applied Biosystems, USA). Próby z materiału nieinwazyjnego były amplifikowane niezależnie co najmniej trzy razy (Taberlet i in. 1996). Akceptowano allele konsensusowe potwierdzone w co najmniej dwóch niezależnych reakcjach PCR.

Spośród 141 zebranych prób materiału biologicznego, 38 odrzucono z uwagi na zbyt duże rozwodnienie. Z kolei na etapie reakcji PCR odrzucono 27 prób ze względu na brak widocznych produktów amplifikacji. Pozostałe 76 prób poddano analizie długości sekwencji mikrosatelitarnych. Na tym etapie odrzucono 14 prób ze względu na: pochodzenie kału od lisa rudego (6 prób), kontaminację odchodów wilka moczem lisa (2 próby), obecność mieszaniny DNA dwóch osobników wilka w jednej próbce (4 próby), brak wyników dla czterech lub więcej

sekwencji mikrosatelitarnych, przez co niemożliwe było wiarygodne porównanie z innymi próbkami (2 próby). Do ostatecznej analizy zakwalifikowano wyniki uzyskane z 62 prób.

Różnorodność genetyczną wilków zdefiniowano za pomocą następujących parametrów: (1) liczba alleli ( $N_a$ ); (2) efektywna liczba alleli ( $N_e$ ); (3) różnorodność alleliczna ( $A_R$ ); (4) indeks różnorodności Shannona ( $I$ ); (5) heterozygotyczność obserwowana ( $H_o$ ); (6) heterozygotyczność oczekiwana ( $H_e$ ) oraz współczynnik inbredu ( $F_{IS}$ ). Dla każdego parametru obliczono średnie ze wszystkich loci wraz z błędem standardowym średniej (SE). Obliczenia wykonano w programach GenALEX (Peakall i Smouse 2012) i FSTAT (Goudet 1995).

**Tab. 1.** Wskaźniki różnorodności genetycznej w tatrzańskiej populacji wilka

*Table 1. Parameters of genetic diversity of the wolf population in the Tatra Mountains*

Locus	N	$N_a$	$N_e$	$A_R$	I	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
CPH5	41	3,000	1,795	3,993	0,788	0,415	0,443	0,002
FH2001	41	4,000	3,087	5,719	1,238	0,683	0,676	-0,053
FH2010	41	3,000	1,814	3,985	0,749	0,488	0,449	-0,030
FH2017	40	4,000	2,819	4,499	1,164	0,750	0,645	-0,164
FH2054	38	9,000	5,858	2,936	1,911	0,737	0,829	-0,075
FH2087	41	6,000	4,085	3,986	1,538	0,805	0,755	-0,150
FH2088	42	4,000	2,602	8,086	1,084	0,571	0,616	0,102
FH2096	41	4,000	2,553	4,494	1,124	0,634	0,608	0,105
FH2137	41	9,000	5,109	3,729	1,841	0,732	0,804	0,084
FH2140	42	4,000	3,222	3,999	1,266	0,524	0,690	0,252
FH2161	41	6,000	3,104	7,984	1,366	0,732	0,678	0,125
PEZ17	40	5,000	3,351	5,613	1,329	0,825	0,702	-0,067
vWF	40	5,000	2,730	3,000	1,210	0,575	0,634	0,076
Średnia	40,692	5,077	3,241	4,771	1,278	0,652	0,656	0,019
SE	0,286	0,548	0,326	1,596	0,095	0,035	0,032	0,115

N – liczba prób,  $N_a$  – liczba alleli,  $N_e$  – liczba alleli efektywnych,  $A_R$  – różnorodność alleliczna, I – indeks różnorodności Shannona,  $H_o$  – heterozygotyczność obserwowana,  $H_e$  – heterozygotyczność oczekiwana,  $F_{IS}$  – współczynnik inbredu  
*N – number of samples,  $N_a$  – number of different alleles,  $N_e$  – number of effective alleles,  $A_R$  – allelic richness, I – Shannon's information index,  $H_o$  – observed heterozygosity,  $H_e$  – expected heterozygosity,  $F_{IS}$  – inbreeding coefficient*

## Wyniki

W zakwalifikowanych do analiz 62 próbach materiału biologicznego zidentyfikowano DNA 42 osobników. Spośród nich 14 osobników odnaleziono w obrębie Tatrzańskiego Parku Narodowego, a 1 osobnik zidentyfikowany został na Pogórze Gubałowskim w dalszym sąsiedztwie parku po polskiej stronie granicy. Kolejne 27 osobników zidentyfikowano w materiale zebranym na terenie słowackiej części Tatr i Podtatrza.

Wszystkie loci w populacji wilka w Tatrach były polimorficzne. Średnia liczba alleli na locus była wysoka i wyniosła  $N_a=5,077$  ( $SE\pm 0,548$ , zakres od 3 do 9). Z kolei średnia efektywna liczba alleli wyniosła  $N_e=3,241$  ( $SE\pm 0,326$ , zakres od 1,795 do 5,858), a średnia wartość

różnorodność alleliczną  $A_R=4,771$  ( $SE\pm 1,596$ , zakres od 2,936 do 8,086). Indeks różnorodności Shannona miała wartość  $I=1,278$  ( $SE\pm 0,095$ , zakres od 0,749 do 1,911) (tab. 1).

Dla populacji wilka w Tatrach heterozygotyczność obserwowana wynosiła  $H_o=0,652$  ( $SE\pm 0,035$ , zakres od 0,415 do 0,825), natomiast heterozygotyczność oczekiwana  $H_e=0,656$  ( $SE\pm 0,032$ , zakres od 0,443 do 0,829). Ponieważ oba te parametry u wilków w Tatrach są niemal identyczne, można przyjąć, że populacja nie odbiega znacząco od stanu równowagi Hardy'ego-Weinberga. Niska wartość współczynnika inbrodu  $F_{IS}=0,019$  ( $SE\pm 0,115$ , zakres od -0,164 do 0,252) (tab. 1) wskazuje na brak krzyżowania się osobników w bliskim pokrewieństwie.

## Dyskusja

Prowadzone wcześniej w różnych częściach kraju badania oparte na analizie mitochondrialnego DNA, wykazały istotne genetyczne różnice pomiędzy wilkami zamieszkującymi Karpaty oraz niziny Polski. W Karpatach przeważały osobniki z haplogrupy 2, głównie posiadające haplotyp H6 i H14, natomiast na nizinach wykazywano wilki z haplogrupy 1, przede wszystkim z haplotypami H1 oraz H2. Odrębność genetyczną tych dwóch populacji potwierdzono analizami sekwencji mikrosatelitarnych, wykonanymi zarówno statystyką Wrighta (wartości  $F_{ST}$  wskazywały na średnie lub wysokie wartości dystansu genetycznego), jak i przy wykorzystaniu programu STRUCTURE opierającego się na statystyce Bayesowskiej. Próby z wilków zamieszkujących Tatry grupowały się w obu analizach wraz z próbami z pozostałych regionów Karpat (Czarnomska i in. 2013, Hulva i in. 2018).

Parametry różnorodności genetycznej wilków zamieszkujących Tatry nie odbiegają od wyników uzyskanych w innych regionach Polski z prób zebranych w latach 2001-2009, gdzie średnia liczba alleli wahała się od 4,0 do 4,8, heterozygotyczność obserwowana wynosiła od 0,45 do 0,58, a heterozygotyczność oczekiwana wahała się od 0,63 do 0,69 (Czarnomska i in. 2013). Nowsze badania nad wilkami z Wigierskiego Parku Narodowego (próby zebrane w latach 2015-2017) również pokazały parametry zbliżone do wartości uzyskanych w Tatrach, tj. średnią liczbę alleli wynoszącą 4,5, heterozygotyczność obserwowaną na poziomie 0,73, przy heterozygotyczności oczekiwanej równej 0,57 (Romański i in. 2018). Stwierdzone w naszych badaniach wartości różnorodności allelicznej (4,77) były jednak niższe niż te uzyskane na innym zestawie markerów mikrosatelitarnych dla obszaru całych Karpat Zachodnich (7,38 – Hulva i in. 2018), co mogłoby sugerować na ograniczony przepływ genów między Tatrami i sąsiednimi pasmami górskimi. Jednak średnia wartość współczynnika inbrodu ( $F_{IS}$ ) była zbliżona do zera, co wskazuje na brak długotrwałej izolacji tatrzańskiej subpopulacji wilka i dostępność do rozrodu osobników niespokrewnionych.

Wyniki badań genetycznych wilków z Tatr dobrze korespondują także z analizami przeprowadzonymi wcześniej w różnych regionach Europy. W zależności od populacji średnia liczba alleli waha się od 3,7 do 7,6, heterozygotyczność obserwowana oscyluje od 0,52 do 0,76, a heterozygotyczność oczekiwana od 0,55 do 0,73 (Hindrikson i in. 2017).

## Podziękowania

Badania dofinansowano ze środków funduszu leśnego Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasy Państwowe przekazanych Tatrzańskiemu Parkowi Narodowemu w 2018 roku. Za pomoc w zbiorze prób dziękujemy pracownikom Tatrzańskiego Parku Narodowego (w tym zwłaszcza Radosławowi Matei, Maciejowi Klimeckiemu, Andrzejowi Krzeptowskiemu-

-Sabale, Pawłowi Kauzalowi, Zbigniewowi Mierczakowi, Andrzejowi Chowańcowi, Józefowi Bobakowi, Ryszardowi Suskiemu, Antoniemu Ziębie), Tatraského Národného Parku (Ján Hoľma, Mikuláš Tajboš, Juraj Mikuš, Juraj Ksiažek) oraz zarządu lasów państwowych TANAPu (Ivan Krasul'a, Martin Špiak).

## Literatura

- Allendorf F.W., England P.R., Luikart G., Richie P.A., Ryman N. 2008. Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 327-337.
- Åkesson M., Liberg O., Sand H., Wabakken P., Bensch S., Flagstad Ø. 2016. Genetic rescue in a severely inbred wolf population. *Molecular Ecology* 25: 4745-4756.
- Butchard S.H.M., Walpole M., Collen B., von Strien A., Scharlemann J.P., Almond R.E.A., Baillie J.E.M., Bomhard B., Brown C., Bruno J., Carpenter K.E., Carr G.M., Chanson J., Chenery A.M., Csirke J., Davidson N.C., Dentener F., Foster M., Galli A., Galloway J.N., Genovesi P., Gregory R.D., Hockings M., Kapos V., Lamarque J.-F., Leverington F., Loh J., McGeoch M.A., McRae L., Minasyan A., Hernández Morcillo M., Oldfield T.E.E., Pauly D., Quader S., Revenga C., Sauer J.R., Skolnik B., Spear D., Stanwell-Smith D., Stuart S.N., Symes A., Tierney M., Tyrrell T.D., Vié J.-C., Watson R. 2010. Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science* 328: 1164-1168.
- Cardinale B.J., Duffy J.E., Gonzales A., Hooper D.U., Perrings C., Venail P., Narwani A., Mace G.M., Tilman D., Wardle D.A., Kinzig A.P., Daily G.C., Loreau M., Grace J.B., Larigauderie A., Srivastava D.S., Naeem S. 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486: 59-67.
- Ceballos G., Ehrlich P.R., Dirzo R. 2017. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: E6089-E6096.
- Chapron G., Kaczensky P., Linnell J.D.C., von Arx M., Huber D., Andrén H., López-Bao J.V., Adamec M., Álvares F., Anders O., Balčiauskas L., Balys V., Bedó P., Bego F., Blanco J.C., Breitenmoser U., Brøseth H., Buřka L., Bunikyte R., Ciucci P., Dutsov A., Engleder T., Fuxjäger C., Groff C., Holmala K., Hoxha B., Iliopoulos Y., Ionescu O., Jeremić J., Jerina K., Kluth G., Knauer F., Kojola I., Kos I., Krofel M., Kubala J., Kunovac S., Kusak J., Kotal M., Liberg O., Majić A., Männil P., Manz R., Marboutin E., Marucco F., Melovski D., Mersini K., Mertzanis Y., Mysłajek R.W., Nowak S., Odden J., Ozolins J., Palomero G., Paunović M., Persson J., Potočník H., Quenette P.-Y., Rauer G., Reinhardt I., Rigg R., Ryser A., Salvatori V., Skrbinšek T., Stojanov A., Swenson J.E., Szemethy L., Trajçe A., Tsingarska-Sedefcheva E., Váňa M., Veeroja R., Wabakken P., Wölf M., Wölf S., Zimmermann F., Zlatanova D., Boitani L. 2014. Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science* 346: 1517-1519.
- Coates D.J., Byrne M., Moritz C. 2018. Genetic diversity and conservation units: dealing with the species-population continuum in the age of genomics. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6: 165.
- Czarnomska S.D., Jędrzejewska B., Borowik T., Niedziałkowska M., Stronen A.V., Nowak S., Mysłajek R.W., Okarma H., Konopiński M., Pilot M., Śmietana W., Caniglia R., Fabbri E., Randi E., Pertoldi C., Jędrzejewski W. 2013. Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics* 14: 573-588.
- de Groot G.A., Nowak C., Skrbinsek T., Andersen L.W., Aspi J., Fumagali L., Godinho R., Harms V., Jansman H.A.H., Liberg O., Marucco F., Mysłajek R.W., Nowak S., Pilot M., Randi E., Reinhardt I., Śmietana W., Szewczyk M., Taberlet P., Vilá C., Munoz-Fuentes V. 2016. Decades of population genetic research call for harmonization of molecular markers: the grey wolf, *Canis lupus*, as a case study. *Mammal Review* 46: 44-59.
- Dirzo R., Young H.S., Galetti M., Ceballos G., Isaac N.J.B., Collen B. 2014. Defaunation in the Anthropocene. *Science* 345: 401-406.
- Dufresnes C., Miquel C., Remollino N., Biollaz F., Salamin N., Taberlet P., Fumagalli L. 2018. Howling from the past: historical phylogeography and diversity losses in European grey wolves. 285: 20181148.



- Estes J.A., Terborgh J., Brashares J.S., Power M.E., Berger J., Bond W.J., Carpenter S.R., Essington T.E., Holt R.D., Jackson J.B.C., Marquis R.J., Oksanen L., Oksanen T., Paine R.T., Pikitch E.K., Ripple W.J., Sandin S.A., Scheffer M., Schoener T.W., Shurin J.B., Sinclair A.R.E., Soulé M.E., Virtanen R., Wardle D.A. 2011. Trophic downgrading of planet Earth. *Science* 333: 301-306.
- Francisco L.V., Langston A.A., Mellersh C.S., Neal C.L., Ostrander E.A. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 7: 359-362.
- Fredholm M., Winterø A.K. 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome* 6: 11-18.
- Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2). A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485-486.
- Hambler C., Canney S.M. 2013. Conservation. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hindrikson M., Remm J., Pilot M., Godinho R., Stronen A.V., Baltrūnaitė L., Czarnomska S.D., Leonard J.A., Randi E., Nowak C., Åkesson M., López-Bao J.V., Álvares F., Llaneza L., Echegaray J., Vilà C., Ozolins J., Rungis D., Aspi J., Paule L., Skrbinšek T., Saarma U. 2017. Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. *Biological Reviews* 92: 1601-1629.
- Hulva P., Černá Bolfiková B., Woznicová V., Jindřichová M., Benešová M., Myslajek R.W., Nowak S., Szewczyk M., Niedźwiecka N., Figura M., Hájková A., Sándor A.D., Zyka V., Romportl D., Kotal M., Findo S., Antal V. 2018. Wolves at the crossroad: fission-fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe *Diversity and Distributions* 24: 179-192.
- Kuijper D.P.J., de Kleine C., Churski M., van Hooft P., Bubnicki J., Jędrzejewska B. 2013. Landscape of fear in Europe: wolves affect spatial patterns of ungulate browsing in Białowieża Primeval Forest, Poland. *Ecography* 36: 1263-1275.
- Lesniak I., Heckmann I., Heitlinger E., Szentiks C.A., Nowak C., Harms V., Jarusch A., Reinhard I., Kluth G., Hofer H., Krone O. 2017. Population expansion and individual age affect endoparasite richness and diversity in a recolonising large carnivore population. *Scientific Reports* 7: 41730.
- Newbold T., Hudson L.N., Hill S.L.L., Contu S., Lysenko I., Senior R.A., Börger L., Bennett D.J., Choimes A., Collen B., Day J., De Palma A., Díaz S., Echeverria-Londoño S., Edgar M.J., Feldman A., Garon M., Harrison M.L.K., Alhousseini T., Ingram D.J., Itescu Y., Kattge J., Kemp V., Kirkpatrick L., Kleyer M., Laginha Pinto Correia D., Martin C.D., Meiri S., Novosolov M., Pan Y., Phillips H.R.P., Purves D.W., Robinson A., Simpson J., Tuck S.L., Weiher E., White H.J., Ewers R.M., Mace G.M., Scharlemann J.P.W., Purvis A. 2015. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature* 520: 45-50.
- Neff M.W., Broman K.W., Mellersh C.S., Ray K., Acland G.M., Aruirre G.D., Ziegler J.S., Ostrander E.A., Rine J. 1999. A second-generation linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 151: 803-820.
- Nowak S., Myslajek R.W. 2016. Wolf recovery and population dynamics in Western Poland, 2001-2012. *Mammal Research* 61: 83-98.
- Nowak S., Myslajek R.W., Jędrzejewska B. 2008. Density and demography of wolf *Canis lupus* population in the western-most part of the Polish Carpathian Mountains, 1996-2003. *Folia zoologica* 57: 392-402.
- O'Bryan C.J., Braczkowski A.R., Beyer H.L., Carter N.H., Watson J.E.M., McDonald-Madden E. 2017. The contribution of predators and scavengers to human well-being. *Nature Ecology & Evolution* 2: 229-236.
- Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Reed D.H., Frankham R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230-237.
- Ripple W.J., Estes J.A., Beschta R.L., Wilmers C.C., Ritchie E.G., Hebblewhite M., Berger J., Elmhagen B., Letnic M., Nelson M.P., Schmitz O.J., Smith D.W., Wallach A.D., Wirsing A.J. 2014. Status and ecological effects of the World's largest carnivores. *Science* 343: 1241484.
- Romański M., Szewczyk M., Niedźwiecka N., Nowak S., Myslajek R.W. 2018. Monitoring wilków (*Canis*

- lupus*) z wykorzystaniem fotopułapek i analiz genetycznych w Wigierskim Parku Narodowym, 2013-2017. *Przegląd Przyrodniczy* 29: 78-95.
- Shibuya H., Collins B.K., Huang T.H., Johnson G.S. 1994. A polymorphic (AGGAAT)<sub>n</sub> tandem repeat in an intron of the canine von Willebrand factor gene. *Animal Genetics* 25: 122.
- Svenning J.-C., Pedersen P.B.M., Donlan C.J., Ejrnæs R., Faurby S., Galetti M., Hansen D.M., Sandel B., Sandom C.J., Terborgh J.W., Vera F.W.M. 2016. Science for a wilder Anthropocene: Synthesis and future directions for trophic rewilding research. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 898-906.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24: 3189-3194.

**Robert W. Mysłajek<sup>1\*</sup>, Maciej Szewczyk<sup>1,2</sup>,  
Tomasz Zwijacz-Kozica<sup>3</sup>, Natalia Niedźwiecka<sup>2</sup>,  
Jarosław Rabiasz<sup>3</sup>, Gabriela Chovancová<sup>4</sup>,  
Erika Feriancová<sup>5</sup>, Michal Figura<sup>2</sup>, Sabina Nowak<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii,  
Instytut Genetyki i Biotechnologii,  
Grupa Genetyki Konserwatorskiej

<sup>2</sup>Stowarzyszenie dla Natury „Wilk”

<sup>3</sup>Tatrzański Park Narodowy

<sup>4</sup>Štátne lesy TANAPu, Słowacja

<sup>5</sup>Správa Tatranského Národného Parku, Słowacja

\*robert.myslajek@igib.uw.edu.pl