

Ocena liczebność głuszca (*Tetrao urogallus*) w Babiogórskim Parku Narodowym na podstawie analiz genetycznych prób nieinwazyjnych

Anna Santorek, Barbara Kuligowska, Sebastian Szczepański,
Beata Dulisz, Robert Rutkowski

Abstrakt. Głuszc *Tetrao urogallus* jest w Polsce gatunkiem krytycznie zagrożonym. Poznanie procesów kształtujących demografię i strukturę populacji tego gatunku jest więc niezwykle ważne dla skuteczności podejmowanych działań ochronnych. Najważniejsze ostoje głuszca znajdują się w Karpatach, między innymi na terenie Babiogórskiego Parku Narodowego. W latach 2016–2017 zebrano próby nieinwazyjne (pióra i odchody, $N = 65$) w celu oszacowania minimalnej liczby osobników żyjących (*Minimum Number of individuals Alive, MNA*) w tej populacji. Każda próba została poddana procesowi izolacji DNA, który posłużył jako matryca do amplifikacji zestawu markerów mikrosatelitarnych. Polimorfizm mikrosatelitarny został wykorzystany do określenia profili genetycznych osobników, które pozostawiły w terenie ślady biologiczne. Analiza uzyskanych wyników wskazała, że w okresie badań na terenie Babiogórskiego Parku Narodowego występowało co najmniej 20 głuszców. Na podstawie stwierdzonych genotypów unikatowych oszacowano poziom zmienności genetycznej w badanej populacji. Porównanie różnorodności allelicznej i heterozygotyczności w loci mikrosatelitarnych z wcześniejszymi danymi sugeruje, że w populacji z Babiogórskiego Parku Narodowego dochodzi do stopniowego obniżania się zmienności genetycznej i wzrostu spokrewnienia między żyjącymi tam osobnikami.

Słowa kluczowe: próby nieinwazyjne, markery mikrosatelitarne, zmienność genetyczna, populacja naturalna, wielkość populacji

Abstract. Estimating the size of the capercaillie (*Tetrao urogallus*) population in Babia Góra National Park by the genetic analysis of non-invasive samples. The capercaillie (*Tetrao urogallus*) is a critically endangered bird species in Poland. This is why it is important to gain an insight into processes shaping population's demography and structure. In this work we applied genetic data to verify the number of the capercaillie in the Babia Góra National Park. The main aim of the study was to estimate the Minimum Number of individuals Alive (*MNA*) in the investigated population. Non-invasive samples – feathers and faeces ($N = 65$) were collected in the field in 2016 and 2017. From each sample we extracted DNA and amplified a set of microsatellite markers to determine genetic profile of the host. We found 20 unique genotypes, meaning that during the study period at least 20 individuals have lived in the park. Based on these unique genotypes, the level of genetic diversity in the population of the capercaillie from Babia Góra National Park was estimated. These results, in

comparison with previous analyses, suggested that the population of the capercaillie in Babia Góra National Park shows an increasing level of inbreeding and loss of genetic diversity.

Key words: non-invasive samples, microsatellites, genetic diversity, wild population, survival

Wstęp

W przypadku gatunków zagrożonych wiedza o liczebności populacji jest kluczowa dla właściwego planowania działań ochronnych i zarządzania populacjami. Jednakże takie dane są bardzo często trudne do uzyskania, szczególnie w przypadku gatunków płochliwych lub prowadzących skryty tryb życia (Schwartz i in. 2007). Głuszcze *Tetrao urogallus* to kurak leśny, w Polsce zagrożony wyginięciem. Liczebność krajowej populacji szacowana jest na zaledwie 380–500 osobników (Zawadzka i in. 2013, Rutkowski i in. 2017a). Podstawową metodą oceny liczebności populacji tego gatunku były wiosenne liczenia na tokach i kontrola śladów obecności ptaków. Były to jednak metody obciążone znacznym błędem (Zawadzka, Zawadzki 2003; Jacob i in. 2010), a ze względu na płochliwość głuszca, w szczególności kur, obecność obserwatora może także negatywnie wpływać na funkcjonowanie populacji, np. poprzez rozpędzanie tokowisk (Zawadzka i in. 2009). Dodatkowo, metody obserwacyjne są trudne do zastosowania w rejonach górskich, gdzie dotarcie do niektórych tokowisk może być niemożliwe (Jacob i in. 2010; Rutkowski i in. 2017b). Natomiast w przypadku populacji głuszca w Polsce rejon górski (polska część Karpat) są najważniejszą ostoją tego gatunku (Żurek, Armatus 2011). Stwierdzono także, że populacja karpacka nie jest jednorodna – poszczególne ostoje są izolowane w różnym stopniu i charakteryzują się zróżnicowanym poziomem zmienności genetycznej (Rutkowski i in. 2005; 2017a).

W Karpatach głuszcze występuje w Tatrach, Gorcach, Beskidzie Śląskim, Sądeckim oraz w Beskidzie Żywieckim z Babią Górą (Zawadzka 2014). W Babiogórskim Parku Narodowym głuszcze wstępuje głównie na południowo-wschodnich i wschodnich masywach Babiej Góry. Populacja ta jest w bezpośrednim kontakcie z populacjami znajdującymi się na Słowacji (południowy stok Babiej Góry), populacjami położonymi na wschód w województwie śląskim, w Beskidzie Śląskim i Żywieckim. W 2003 roku stwierdzono obecność 30 ptaków na terenie Babiogórskiego Parku Narodowego (Cichocki i in. 2008). W 2009 roku liczebność populacji szacowano na około 20 osobników (Żurek, Armatus 2011). Natomiast w 2017 roku liczbę głuszców w Babiogórskim Parku Narodowym ponownie oszacowano na 30 osobników (Żurek, Armatus 2017).

Celem pracy była genetyczna weryfikacja liczebności głuszców w Babiogórskim Parku Narodowym, z wykorzystaniem strategii genotypowania mikrosatelitarnego prób nieinwazyjnych. Zbiór prób nieinwazyjnych nie wymaga kontaktu ze zwierzęciem, eliminując zagrożenia związane z niepokojeniem i płoszeniem, jednocześnie dostarczając materiał do badań genetycznych poszczególnych osobników i populacji (Taberlet, Luikart 1999; Piggott, Taylor 2003). Natomiast markery mikrosatelitarne są od dawna jednym z najpopularniejszych markerów molekularnych, stosowanych w szerokim zakresie badań, poczynając od genetyki populacyjnej i filogeografii, po analizę rodzicielstwa i identyfikację osobniczą (Rutkowski 2005; Selkoe, Toonen 2006). Na podstawie DNA izolowanego z prób nieinwazyjnych możliwa jest iden-

fikacja unikatowego mikrosatelitarnego genotypu osobnika, który pozostawił po sobie dany ślad biologiczny. Strategia genotypowania prób nieinwazyjnych znalazła szerokie zastosowanie w przypadku gatunków zagrożonych (Piggott, Taylor 2003), w tym również w badaniach kuraków leśnych (Rutkowski 2007; Rutkowski i in. 2005, 2012, 2017a; Jacob i in. 2010; Mollet i in. 2015). Zidentyfikowane genotypy pozwalają określić, między innymi, minimalną liczbę osobników występujących na danym terenie (*Minimum Number of individuals Alive* — *MNA*). Wyznaczenie *MNA* opiera się na prostym założeniu – każdy unikatowy genotyp mikrosatelitarny należy do innego osobnika. W ten sposób, analizując profile genetyczne z prób nieinwazyjnych możliwe jest określenie minimalnej liczby osobników, występujących na danym terenie w okresie prowadzenia badań. Jest to liczba minimalna, ponieważ istnieje duże prawdopodobieństwo, że nie uda się znaleźć śladów biologicznych wszystkich osobników, szczególnie w przypadku niezbyt intensywnego zbioru materiału.

Material i metody

Na terenie Babiogórskiego Parku Narodowego w latach 2016-2017 został zebrany materiał nieinwazyjny do badań genetycznych ($N = 65$; 58 piór, 7 odchodów). Odchody zbierano w terenie w taki sposób, by ograniczyć prawdopodobieństwo pobierania wielu niezależnych prób od tego samego osobnika. Wszystkie próby poddano procesowi izolacji DNA i amplifikacji 8 markerów molekularnych – sekwencji mikrosatelitarnych. DNA było izolowane z odchodów i piór zgodnie z metodyką opisaną przez Rutkowskiego i in. (2005, 2012, 2017a). Analizowano 8 markerów mikrosatelitarnych: TUT1, TUT2, TUT3, TUT4 (Segelbacher i in. 2000); TTT1, BG12, BG16 i BG18 (Caizergues i in. 2001; Piertney, Höglund 2001). Markery mikrosatelitarne amplifikowano metodą Multiplex-PCR w dwóch 'miksach' reakcyjnych. W celu kontroli kontaminacji materiału izolacja była przeprowadzana w zestawach po 10 prób, z jedną „próbą ślepą” (zawiera wszystkie odczynniki bez DNA). Również serie PCR zawierały próbę ślepą w celu dalszego uniknięcia i wyeliminowania kontaminacji. Analiza genotypów była przeprowadzana z wykorzystaniem sekwencjatora automatycznego CEQ8000 (Backman Coulter). Za wiarygodne genotypy mikrosatelitarne uznano udaną amplifikację co najmniej 6 z 8 badanych markerów oraz powtarzalność uzyskiwanych genotypów w 5 kolejnych reakcjach PCR. Ponieważ genotypowanie mikrosatelitarne prób nieinwazyjnych jest obciążone szeregiem błędów, wynikających ze słabej jakości uzyskiwanego DNA (Taberlet, Luikart 1999; Broquet i in. 2007), zastosowano liczne procedury, zapobiegające zawyżeniu lub zaniżeniu liczby zidentyfikowanych genotypów unikatowych. Procedury te szczegółowo opisano w pracach Rutkowskiego i in. (2017a i b). Analiza wyników przeprowadzona była w dwóch etapach: (1) zidentyfikowane zostały próby nieinwazyjne o jednakowych genotypach. Przyjęto założenie, że zgodność 6 z 8 badanych markerów mikrosatelitarnych jest dowodem, że próba pochodzi od tego samego osobnika, przy czym niezgodności muszą być wytłumaczone jednym z typowych błędów genotypowania mikrosatelitarnego prób nieinwazyjnych (Taberlet, Luikart 1999). Prawidłowość takiego podejścia została zweryfikowana we wcześniejszych badaniach karpaczej populacji głuszca (Rutkowski i in. 2017a). Na podstawie uzyskanych wyników określono liczbę genotypów unikatowych (niepowtarzających się w innych próbach) w badanej populacji, co pozwala określić *MNA*, czyli minimalną liczbę osobników występujących na danym terenie. Wyżej wymienione analizy przeprowadzono za pomocą programu GenAlEx v. 6.5 (Peakall, Smouse 2006, 2012) (2); dla wszystkich genotypów unikatowych, na podstawie wskaźników polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych, określono poziom zmienności genetycznej bada-

nej populacji: oszacowano liczbę alleli w loci (różnorodność alleliczną, A), heterozygotyczność obserwowaną i oczekiwaną (H_o i H_e) dla poszczególnych loci, jak i wartości średnie tych wskaźników. Dla każdego locus, jak również dla całej populacji określono istotność odchylenia heterozygotyczności obserwowanej od wartości oczekiwanej na podstawie równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE) dokładnym testem Fishera, jak również wartość i istotność współczynnika inbredu F_{IS} . W powyższych analizach wykorzystano program GenAlEx, FSTAT v. 2.9.3 (Goudet 2001) i Genepop on the Web v. 4.0.10 (Raymond, Rousset 1995, Rousset 2008).

Wyniki

Wiarygodne genotypy uzyskano w przypadku 52 prób (80% całości zgromadzonego materiału). W przypadku izolacji z piór udało się uzyskać 49 wiarygodnych genotypów (84% całości materiału z piór), a z odchodów 3 genotypy (42% całości materiałów z odchodów). W przypadku 13 prób (9 odchodów i 4 piór) nie udało się uzyskać wiarygodnych genotypów z powodu braku amplifikacji znacznej części loci lub braku powtarzalności odczytów alleli w analizach kolejnych produktów reakcji PCR. Wśród 52 wiarygodnych genotypów zidentyfikowano 20 genotypów unikatowych. Wskazuje to, że w latach 2016-2017 na terenie Babiogórskiego parku Narodowego występowało co najmniej 20 osobników głuszca ($MNA = 20$).

Wszystkie markery mikrosatelitarne w badanej populacji charakteryzowały się polimorfizmem. W poszczególnych loci stwierdzono od 4 do 7 alleli. Spośród 8 analizowanych loci 5 wykazało istotne odchylenie od równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE). W większości przypadków odchylenie było spowodowane niedoborem heterozygot, wynikającym z różnic między heterozygotycznością obserwowaną a oczekiwaną. Jednakże wartość współczynnika inbredu (F_{IS}) była istotnie wyższa od zera tylko w przypadku locus BG12. Ogólny test na HWE dla wszystkich loci mikrosatelitarnych w populacji wykazał, że populacja nie znajduje się w równowadze genetycznej. Biorąc pod uwagę wszystkie loci wartość F_{IS} wykazała istotny niedobór heterozygot (tab 1).

Tab. 1. Charakterystyka ogólnego poziomu zmienności genetycznej w populacji głuszca z terenu Babiogórskiego Parku Narodowego na podstawie polimorfizmu 8 markerów mikrosatelitarnych. Uwzględniono tylko genotypy unikatowe

Table 1. Characterization of the general level of genetic variability in the capercaillie population from the Babia Góra National Park area based on the polymorphism of 8 microsatellite markers. Only unique genotypes are included

| Locus | N | A | H_o | H_e | HWE | F_{IS} |
|---------|-------|------|-------|-------|-----|----------|
| BG16 | 20 | 6,00 | 0,45 | 0,49 | | 0,109 |
| TTT1 | 20 | 5,00 | 0,40 | 0,49 | * | 0,200 |
| TUT2 | 20 | 6,00 | 0,65 | 0,63 | * | -0,002 |
| BG12 | 20 | 4,00 | 0,40 | 0,69 | * | 0,437 |
| TUT1 | 19 | 4,00 | 0,16 | 0,66 | * | 0,772* |
| TUT4 | 19 | 7,00 | 0,68 | 0,81 | * | 0,178 |
| TUT3 | 20 | 5,00 | 0,45 | 0,54 | | 0,193 |
| BG18 | 19 | 4,00 | 0,63 | 0,54 | | -0,149 |
| Średnia | 19,63 | 5,13 | 0,48 | 0,60 | * | 0,235* |

N – liczba prób, w których udało się zamplifikować dany marker; A – różnorodność alleliczna; H_o – heterozygotyczność; H_e – heterozygotyczność; HWE – wynik testu bezpośredniego Fishera na równowagę Hardy'ego-Weinberga; F_{IS} – współczynnik inbredu; * – istotne odchylenie od równowagi Hardy'ego-Weinberga ($P < 0.05$) lub istotna wartość F_{IS} (korekta poziomu istotności dla porównań wielokrotnych metodą Bonferroniego, $P = 0.005$)

Dyskusja

Genotypowanie mikrosatelitarne prób nieinwazyjnych jest często stosowaną strategią w przypadku monitorowania populacji gatunków zagrożonych (Beja-Pereira i in. 2009, Regnaut i in. 2006). Materiał nieinwazyjny jest często jedynym materiałem biologicznym, możliwym do pozyskania w ilościach pozwalających na wnioski o procesach zachodzących w populacji. Jednakże, wykorzystanie takich prób i genotypowanie mikrosatelitarne w oparciu o matrycę DNA izolowanego z prób nieinwazyjnych wiąże się z określonymi problemami technicznymi, ponieważ ten rodzaj materiału jest w znacznym stopniu pofragmentowany oraz zanieczyszczony obcym DNA (Taberlet, Luikart 1999, Broquet i in. 2007). Następstwem tego mogą być problemy z określaniem wiarygodnych genotypów w przypadku pewnej części prób. Badania kuraków leśnych wskazują, że sukces genotypowania (udział prób w przypadku których udało się określić wiarygodne genotypy w całej puli analizowanego materiału) waha się od 40–60% (Segelbacher 2002, Jacob i in. 2010, Rutkowski i in. 2017b). W przypadku Babiogórskiego Parku Narodowego próby, z których udało się uzyskać wiarygodne genotypy, stanowiły 80% zebranego materiału. Zazwyczaj wynik ten jest niższy, np. podczas podobnych badań, prowadzonych na tatrzańskej populacji głuszcza udział prób nieinwazyjnych, które udało się wiarygodnie zgenotypować wynosił 60% (Rutkowski i in. 2017b). Wśród prób zebranych na terenie Babiogórskiego Parku Narodowego (niniejsza praca), większość stanowiły pióra – natomiast w przypadku badań przeprowadzonych na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego (Rutkowski i in. 2017b), genotypowanie było niemal w całości oparte na odchodach. Wskazuje to, że nieinwazyjnie pozyskiwane pióra (np. z paprzysek, gniazd lub noclegowisk) są lepszym materiałem do badań genetycznych. DNA izolowany z odchodów jest bardziej zdegradowany, gdyż prawdopodobnie ulega uszkodzeniu hydrolitycznemu i rozkładowi enzymatycznemu (Litvaitis, Litvaitis 1996). Jednakże w niektórych badaniach, wykorzystujących odchody głuszców jako źródło DNA, do genotypowania mikrosatelitarne, sukces amplifikacji był bardzo wysoki – blisko 90% (Mollet i in. 2015). Wszystkie próby były pozyskiwane w okresie zalegania pokrywy śnieżnej. Wskazuje to, że śnieg i mróz są naturalnymi czynnikami, zwiększającymi przydatność odchodów do analiz genetycznych, co było także sugerowane na podstawie wyników badań innego kuraka leśnego – jarzabka *Tetrastes bonasia* (Rutkowski i in. 2012). Próby z Babiogórskiego Parku Narodowego również pozyskiwane były w okresie zalegania pokrywy śnieżnej. Być może wpłynęło to na wyższy niż w niektórych innych badaniach sukces amplifikacji w oparciu o DNA z piór (84% wszystkich zebranych piór). Na przykład, przy podobnych założeniach (brak możliwości określenia genotypu w maksymalnie dwóch loci) Segelbacher (2002) uzyskał wiarygodne genotypy w przypadku 42% piór.

Badana populacja głuszcza z Babiogórskiego Parku Narodowego nie znajduje się w równowadze Hardy'ego-Weinberga (test Fishera: $P < 0,05$; $F_{IS} = 0,235$, wartość istotna statystycznie po korekcie Bonferroniego). Jest wiele procesów, prowadzących do odchylenia heterozygotyczności obserwowanej od oczekiwanej. W przypadku gatunków takich jak głuszcze brak genetycznej równowagi w populacji może być spowodowany tokowiskowym systemem rozrodu (Rutkowski i in. 2013), jak również podziałem populacji na podjednostki, wynikającym z fragmentacji dostępnych siedlisk (Rutkowski i in. 2005). W przypadku prób nieinwazyjnych błędy

w genotypowaniu markerów mikrosatelitarnych także prowadzą do zaniżenia heterozygotyczności oczekiwanej (Taberlet, Luikart 1999). Problemy wynikające ze specyfiki niektórych loci mikrosatelitarnych, na przykład obecność tzw. 'alleli zerowych' (brak możliwości amplifikacji niektórych alleli mikrosatelitarnych w reakcji PCR, wynikający z mutacji w regionie przyłączenia starterów) czy sprzężenie markera z chromosomami płci, mogą także spowodować uzyskanie istotnego odchylenia, choć populacja znajduje się w równowadze genetycznej. W przypadku niniejszych badań jeden z markerów mikrosatelitarnych (TUT1) charakteryzował się szczególnie wysokim niedoborem heterozygot ($F_{IS} = 0,772$), co sugerowało obecność alleli zerowych w tym locus. Jednakże nawet po usunięciu tego markera z analiz (dane nieprezentowane) ogólny współczynnik inbredu populacji był wysoki i istotny statystycznie ($F_{IS} = 0,148$). Choć wynik ten należy interpretować ostrożnie, ze względu na relatywnie niską liczbę pozyskanych prób nieinwazyjnych i zidentyfikowanych genotypów, to jednak wartość współczynnika inbredu może sugerować wysokie spokrewnienie osobników zasiedlających Babiogórski Park Narodowy. W badaniach przeprowadzonych na tej populacji w latach 2010-2013 stwierdzono znacznie niższy współczynnik inbredu ($F_{IS} = 0,07$) (Rutkowski i in. 2017a). Jest możliwe, że w populacji głuszcza z Babiogórskiego Parku Narodowego dochodzi do stopniowego wzrostu spokrewnienia osobników, wynikającego z izolacji i małej liczebności tej populacji.

Rzeczywiście, zarówno dane obserwacyjne, jak i genetyczne wskazują, że populacja z Babiogórskiego Parku Narodowego jest bardzo nieliczna. Wyniki analiz genetycznych sugerują występowanie w latach 2016-2017 około 20 osobników. Jest to liczba niższa od wielkości populacji szacowanej na podstawie obserwacji: 30 ptaków (Żurek, Armatus 2017). Różnica ta może wynikać z przeszacowania rzeczywistej liczby osobników występujących na danym terenie, podczas liczenia ptaków metodami obserwacyjnymi (Jacob i in. 2010, Rutkowski i in. 2015), np. kilkukrotna obserwacja tego samego ptaka i kwalifikowanie go jako różne osobniki, ale także z powodu zgromadzenia zbyt małej liczby prób do badań genetycznych. Większa liczba prób nieinwazyjnych prawdopodobnie pozwoliłaby na znalezienie kolejnych genotypów, na co wskazuje fakt, że aż 8 z uzyskanych profili genetycznych odnaleziono tylko w pojedynczych próbach. W latach 2010-2013 na podstawie badań genetycznych z Babiogórskim Parku Narodowym stwierdzono 35 unikatowych genotypów (Rutkowski i in. 2017a), jednak analizowano wtedy zdecydowanie większą liczbę prób ($N = 204$).

Wcześniejsze badania, oparte na materiale zebrany w latach 2010-2013 (Rutkowski i in. 2017a), sugerowały, że w porównaniu z innymi krajowymi ostojami głuszcza, populacja z Babiogórskiego Parku Narodowego charakteryzuje się średnim poziomem zmienności genetycznej, szacowanym na podstawie polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych. Średnia liczba alleli w badanych loci ($A = 4,78$) była wyższa niż w najbardziej izolowanych populacjach głuszcza w Polsce (Puszcza Solska, Ostoja Gorczańska), lecz niższa niż w Puszczy Augustowskiej i Tatrach (Rutkowski i in. 2015). Jednocześnie w Babiogórskim Parku Narodowym stwierdzono jednak jedną z najniższych heterozygotyczności (Rutkowski i in. 2017a). Obecne badania potwierdziły taki wzorec. Zidentyfikowano bardzo podobną liczbę alleli mikrosatelitarnych ($A = 5,13$), oraz niską heterozygotyczność obserwowaną ($H_o = 0,48$). Ten wynik może sugerować pojawianie się w Babiogórskim Parku Narodowym osobników z innych populacji, na przykład ze słowackiej części Karpat lub innych, polskich populacji karpaccich, położonych na zachodzie (Beskid Żywiecki). Jednakże niska heterozygotyczność oczekiwana i sygnalizowane wcześniej odchylenie od równowagi Hardy'ego–Weinberga może sugerować, że imigrujące osobniki nie przystępują z sukcesem do rozrodu w populacji z Babiogórskiego Parku

Narodowego. Zarówno zagadnienia związane z dyspersją osobników na terenie Karpat, jak i okresowymi zmianami w poziomie zmienności genetycznej w populacji głuszcza z Babiogórskiego Parku Narodowego powinny stanowić przedmiot dalszych badań z wykorzystaniem narzędzie genetycznych.

Podsumowanie / Konkluzje

Na terenie Babiogórskiego Parku Narodowego stwierdzono obecność co najmniej 20 osobników głuszcza. Ponieważ jest to liczba mniejsza niż wielkość populacji oszacowana we wcześniejszych latach (2010–2013), uzyskany wynik może sugerować tendencję spadkową liczebności głuszcza w Babiogórskim Parku Narodowym. Należy jednak zwrócić uwagę, że relatywnie niska liczba prób nieinwazyjnych, zebranych w ramach powyższych badań, mogła unie możliwić stwierdzenie obecności znacznej części osobników.

Badana populacja nie znajduje się w równowadze Hardy'ego–Weinberga. Istotny niedobór heterozygot może wynikać z kojarzenia się osobników spokrewnionych w izolowanej, mało licznej populacji lub pojawiania się na terenie badań głuszców z innych karpaccich populacji, które jednak nie przystępują z sukcesem do rozrodu w Babiogórskim Parku Narodowym.

Podziękowania

Badania sfinansowano ze środków Funduszu Leśnego na podstawie umowy nr EZ.0290.1.1.2017 z Babiogórskim Parkiem Narodowym w ramach projektu „Ocena liczebności głuszcza *Tetrao urogallus* L. na terenie Babiogórskiego Parku Narodowego na podstawie analizy genetycznej z odchodów i piór”.

Literatura

- Beja-Pereira A., Oliveira R., Alves P.C., Schwartz M.K., Luikart G. 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* 9: 1279-1301.
- Broquet T., Ménard N., Petit E. 2007. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics* 8: 249-260.
- Caizergues A., Dubois S., Mondor G., Rasplus J-F. 2001. Isolation and characterisation of microsatellite loci in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes*, 1: 36-38
- Cichoński W., Głowacz M., Pawlikowski P., Zięba F. 2008. Rozmieszczenie i liczebność cietrzewia i głuszcza w województwie małopolskim – stan na 2003 rok. W: Ochrona Kuraków Leśnych. Monografia Pokonferencyjna. Janów Lubelski 16-18 października 2007 r. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa.
- DeMay S.M., Becker P.A., Rachlow J.L., Waits L.P. 2017. Genetic monitoring of an endangered species recovery: demographic and genetic trends for reintroduced pygmy rabbits (*Brachylagus idahoensis*). *Journal of Mammalogy* 92(2): 350-364.
- Goudet J. 2001. FSTAT V2.9.3, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Jacob G., Debrunner R., Gugerli F., Schmid B., Bollmann K. 2010. Field surveys of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Swiss Alps underestimated local abundance of the species as revealed by genetic analyses of non-invasive samples. *Conservation Genetics* 11(1): 33-44.
- Litvaitis M.K., Litvaitis J.A. 1996. Using mitochondrial DNA to inventory the distribution of remnant populations of New England cottontails. *Wild Soc Bulletin* 24: 725-730.
- Merta D., Zawadzka D., Krzywiński A. 2015. Efektywność projektów reintrodukcji głuszcza (*Tetrao*

- urogallus*) w Europie. Sylwan 159 (10): 863-871.
- 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.
- 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.
- Piertney S. B., Höglund J. 2001. Polymorphic microsatellite DANN markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). Molecular Ecology Notes 1: 303-304.
- Piggott M.P. Taylor A.C. 2003. Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. Wildlife Research 30: 1-13.
- Pilot M. 2005. Zastosowanie metod genetyki molekularnej w badaniach ekologicznych. W: Pilot M., Rutkowski R. (red.). Zastosowanie metod molekularnych w badaniach ekologicznych, ss. 7-23. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa.
- Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism, Journal of Heredity 86: 248-249.
- Regnaut S., Lucas F., Fumagalli L. 2006. DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive studies of threatened Capercaillie populations. Conservation Genetics 7: 449-453.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8: 103-106.
- Rutkowski R. 2005. Sekwencje mikrosatelitarne i ich wykorzystanie w badaniach zoologicznych. W: Pilot M., Rutkowski R. (red.). Zastosowanie metod molekularnych w badaniach ekologicznych, ss. 65-77. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa.
- Rutkowski R., Niewęglowski H., Dziedzic R., Kmieć M., Goździewski J. 2005. Genetic variability of Polish population of the Capercaillie *Tetrao urogallus*. Acta Ornithologica 40: 27-34.
- Rutkowski R., Keller M., Jagólkowska P. 2007. Populacje i podgatunki – genetyka molekularna w badaniach europejskich głuszcowatych Tetraonidae. Notatki Ornitologiczne 48 (4): 259-272.
- Rutkowski R., Keller M., Jagólkowska P. 2012. Population genetics of the hazel hen *Bonasa bonasia* in Poland assessed with non-invasive samples. Central European Journal of Biology 7: 759-775
- Rutkowski R., Suchecka E., Zawadzka D. 2013. Migracyjność zależna od płci a genetyczna struktura populacji kuraków leśnych. Postępy Techniki w Leśnictwie 122: 28-33.
- Rutkowski R., Krzan P., Suchecka E. 2015. Charakterystyka genetyczna populacji głuszcza w Tatrzańskim Parku Narodowym na tle innych karpackich populacji gatunku. Nauka Tatrom, t. II – Nauki Biologiczne, Zakopane: 47-52.
- Rutkowski R., Zawadzka D., Suchecka E., Merta D. 2017a. Conservation genetics of the capercaillie in Poland – Delineation of conservation units. PLoS One 12(4): e0174901.
- Rutkowski R., Dulisz B., Szczepański S., Nowakowski J.J., Zwijacz-Kozica T., Krzan P. 2017b: Conservation genetics of the capercaillie in Poland – estimating the size of the Tatra National Park population by the genotyping of non-invasive samples. Fragmenta Faunistica 60 (2): 119-128.
- Schwartz M.K., Luikart G., Waples R.S. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends in Ecology and Evolution 22 (1): 25-33.
- Segelbacher G., Paxton R. J., Steinbruck G., Trontelj P., Storch I. 2000. Characterization of microsatellites in capercaillie *Tetrao urogallus* (AVES). Molecular Ecology 9: 1934-1935.
- Segelbacher G. 2002. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. Molecular Ecology Notes 2: 367-369.
- Selkoe K.A., Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters 9: 615-629.
- Taberlet P., Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. Biological Journal of the Linnean Society 68: 41-55. doi:10.1111/j.1095-8312.1999.tb01157.x
- Zawadzka D., Zawadzki J. 2003. Głuszczyk. Monografie przyrodnicze. Klub Przyrodników. Świebodzin.
- Zawadzka D., Zawadzki J., Keller M. 2009. Głuszczyk *Tetrao urogallus*. W: Chylarecki P., Sikora A., Cenian Z. (red.). Monitoring ptaków lęgowych. Poradnik metodyczny dotyczący gatunków chronionych Dyrektywą Ptasią. GIOŚ, Warszawa, ss. 302-311.

- Zawadzka D., Ciach M., Żurek Z. 2013. Głuszczyk *Tetrao urogallus*. W: Zawadzka D., Ciach M., Figarski T., Kajtoch Ł., Rejt Ł. (red.). Materiały do wyznaczania i określania stanu zachowania siedlisk ptasich w obszarach specjalnej ochrony ptaków Natura 2000, ss. 114-120. GDOŚ, Warszawa.
- Zawadzka D. 2014. Podręcznik najlepszych praktyk ochrony głuszca i cietrzewia. CKPŚ, Warszawa.
- Żurek Z., Armatys P. 2011. Występowanie głuszca *Tetrao urogallus* w polskich Karpatach Zachodnich – wnioski z monitoringu w latach 2005-2010 oraz końcowa ocena liczebności karpacczych subpopulacji głuszca i cietrzewia. Stud. i Mat. CEPL, Rogów 27 (2): 229-240.
- Żurek Z., Armatys P. 2017. Głuszczyk w polskich Karpatach Zachodnich – występowanie, zagrożenia, metody ochrony w świetle dokumentacji do krajowego programu ochrony głuszca. Biologia, ekologia i ochrona kuraków w Polsce i w Europie, 6-8 września 2017. Zamek Kliczków.

**Anna Santorek¹, Barbara Kuligowska²,
Sebastian Szczepański¹, Beata Dulisz³, Robert Rutkowski¹**

¹Muzeum i Instytut Zoologii PAN,

²Babiogórski Park Narodowy

³Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Plac Łódzki

robertrut@miiz.waw.pl