

**RAPORT  
Z REALIZACJI PROJEKTU**

**Wykorzystanie metod molekularnych do oceny  
liczebności i zróżnicowania genetycznego wilków  
*Canis lupus* w Tatrzańskim Parku Narodowym**

**dr inż. Robert W. Mysłajek  
dr hab. Sabina Pierużek-Nowak  
dr Maciej Szewczyk  
dr Natalia Niedźwiecka**



Badania sfinansowano ze środków funduszu leśnego Państwowego  
Gospodarstwa Leśnego Lasy Państwowe przekazanych Tatrzańskiemu  
parkowi Narodowemu w 2018 roku

*Niniejszy raport wykonano zgodnie z umową nr ZP/475/2018 z dn. 03.08.2018 r.  
zawartą pomiędzy Tatrzańskim Parkiem Narodowym, a Stowarzyszeniem dla  
Natury „Wilk”*

**Stowarzyszenie dla Natury „Wilk”  
Twardorzeczka 2018**

## Wstęp

Wilki *Canis lupus* przez wieki były poddane intensywnej presji łowieckiej. W Polsce polowania doprowadziły do znacznej redukcji liczebności populacji i zasięgów jego występowania (Wolsan i in. 1992, Nowak i Mysłajek 2017). W latach 90. XX wieku organizacje przyrodnicze zainicjowały szeroką kampanię społeczną na rzecz ochrony tego gatunku. Dzięki niej wilka objęto ochroną w całym kraju w roku 1998 (Mysłajek i Nowak 2014). Powstrzymanie odstrzałów poskutkowało odbudową populacji wilka, który ponownie zasiedlił większość swoich dawnych ostoi zarówno w zachodnich Karpatach (Nowak i in. 2008), jak i w zachodniej Polsce (Nowak i Mysłajek 2016).

Duże drapieżniki, bezpośrednio poprzez drapieżnictwo, jak i pośrednio np. zmieniając przestrzenne i czasowe użytkowanie środowiska przez inne gatunki, czyli kształtując tzw. krajobraz strachu (Laundré i in. 2010), wpływają na funkcjonowanie całego ekosystemu (Miller i in. 2012, Kuijper i in. 2013). Z punktu widzenia koncepcji usług ekosystemowych, tj. materialnych i niematerialnych korzyści, jakie ludzie uzyskują od ekosystemów (Millennium Ecosystem Assessment, 2003), wilki dostarczają przede wszystkim istotnych usług kulturowych (Duffield i in. 2008) oraz regulacyjnych (Ripple i in. 2014). Wilk został wymieniony w załączniku II Dyrektywy Siedliskowej Unii Europejskiej, dlatego dla ochrony jego ostoi tworzy się specjalne obszary ochrony siedlisk w ramach sieci Natura 2000 (Diserens i in. 2017), jednak w Polsce ważne obszary występowania wilka chronione są również w parkach narodowych (Jamroz 2015).

Kluczowym działaniem dla planowania ochrony wilka jest ocena liczebności, a także określenie różnorodności genetycznej populacji (Boitani i in. 2015). Monitoring wilków jest trudny, ponieważ żyją one w niskich zagęszczeniach, użytkują ogromne terytoria, a dystanse dyspersji młodych osobników często przekraczają kilkaset kilometrów. Klasyczne metody oceny liczebności populacji polegające na tropieniach są pracochłonne i w dużej mierze uzależnione od obecności śniegu (Nowak i in. 2008, Blanco i Cortés 2012). Współcześnie dostępne są jednak nowocześniejsze techniki, takie jak analizy genetyczne oparte na materiale nieinwazyjnym, które umożliwiają ocenę liczebności populacji (Nowak i Mysłajek 2007, Galaverni i in. 2012).

Celem niniejszej pracy była ocena liczebności i różnorodności genetycznej wilka w Tatrzańskim Parku Narodowym i jego sąsiedztwie.

## **Material i metody**

W 2018 roku, podczas całorocznych tropień, zebrano 103 próby materiału biologicznego, w tym z odchodów, moczu i sierści. Wilcze odchody były przechowywane w plastikowych pojemnikach (50 ml) wypełnionych 96% alkoholem etylowym. Sierść znajdowana na legowiskach wilków przechowywana była na sucho, w papierowych kopertach z dodatkiem żelu krzemionkowego w celu pochłaniania wilgoci. Mocz (15 ml) zbierano zimą ze śniegu do probówek typu Falcon zawierających 30 ml 96% etanolu i 1,5 ml 3 M octanu sodu.

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 przeznaczonym do przetwarzania materiału zebranego w sposób nieinwazyjny. Wyekstrahowane 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 oceny płci zamplifikowano fragment chromosomów DBX intron 6 oraz DBY intron 7. Szczegóły przebiegu reakcje multiplex PCR można znaleźć w pracy Lesniak i in. (2017).

Produkty 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. Pokrewieństwa wewnątrz grup rodzinnych wilków rekonstruowano poprzez analizy w programach Cervus (Kalinowski i in. 2007) oraz Kingroup (Konovalov i in. 2004), których wyniki następnie weryfikowano poprzez porównanie genotypów.

## Wyniki

Spośród 103 prób materiału biologicznego, na etapie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) odrzucono 27 prób ze względu na brak widocznych produktów amplifikacji (brak wilczego DNA). Pozostałe 76 prób poddano analizie długości sekwencji mikrosatelitarnych. Na tym etapie odrzucono 14 prób ze względu na: pochodzenie prób kału od lisa rudego (6 prób), kontaminację kału 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.

Z zakwalifikowanych 62 prób zidentyfikowano 42 osobniki (Aneks 1). Spośród nich 14 osobników odnaleziono w obrębie Tatrzańskiego Parku Narodowego i jego sąsiedztwie po polskiej stronie granicy. Jeden osobnik, samica, był wilkiem w trakcie dyspersji i pochodził z Beskidu Żywieckiego (Mapa 1). Kolejne 27 osobników zidentyfikowano w materiale zebranym na terenie słowackiej części Tatr.

Różnorodność genetyczną wilków w Tatrzańskim Parku Narodowym i jego sąsiedztwie zdefiniowano za pomocą następujących parametrów: (1) liczba alleli  $N_a$ ; (2) efektywna liczba alleli  $N_e = 1 / (\sum p_i^2)$ , tj. oczekiwana liczba alleli o równej frekwencji, która dawałaby oszacowaną heterozygotyczność obserwowaną; oraz (3) Indeksu Shannona  $I = -1 \times \sum(p_i \times \ln(p_i))$ . Wszystkie loci w populacji wilka w Tatrach były polimorficzne. Średnia liczba alleli na locus była wysoka i wyniosła 5,077 ( $SE \pm 0,548$ , zakres od 3 do 9). Z kolei średnia efektywna liczba alleli wyniosła 3,241 ( $SE \pm 0,326$ , zakres od 1,795 do 5,858), a średnia wartość indeksu Shannona miała wartość 1,278 ( $SE \pm 0,095$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Różnorodność genetyczna wilków w Tatrach.

Locus	Liczebność próby N	Liczba alleli $N_a$	Liczba alleli efektywnych $N_e$	Indeks Shannona I
FH2001	41	4,000	3,087	1,238
FH2087	41	6,000	4,085	1,538
FH2096	41	4,000	2,553	1,124
PEZ17	40	5,000	3,351	1,329
FH2010	41	3,000	1,814	0,749
FH2017	40	4,000	2,819	1,164
FH2137	41	9,000	5,109	1,841

<b>vWF</b>	40	5,000	2,730	1,210
<b>FH2088</b>	42	4,000	2,602	1,084
<b>FH2140</b>	42	4,000	3,222	1,266
<b>FH2054</b>	38	9,000	5,858	1,911
<b>FH2161</b>	41	6,000	3,104	1,366
<b>CPH5</b>	41	3,000	1,795	0,788
<b>Średnia</b>	40,692	5,077	3,241	1,278
<b>SE</b>	0,286	0,548	0,326	0,095

Aby poznać ewentualne zagrożenia związane z krzyżowaniem się wilków w bliskim pokrewieństwie obliczono: (1) heterozygotyczność obserwowaną ( $H_o$ ), wynikającą z podzielenia liczby heterozygot w danym locus przez całkowitą liczbę zbadanych osobników oraz (2) heterozygotyczność oczekiwaną ( $H_e$ ), czyli taką heterozygotyczność, której należałoby się spodziewać, jeżeli populacja znajduje się w równowadze Hardy’ego-Weinberga. Dla populacji wilka w Tatrach  $H_o=0, 0,652(SE\pm 0,035)$ , natomiast  $H_e=0,656 (SE\pm 0,032)$  (Tabela 2). Porównując te dwa parametry można określić, czy heterozygotyczność w populacji jest istotnie różna od heterozygotyczności wynikającej z równowagi Hardy’ego-Weinberga. Ponieważ oba te parametry u wilków w Tatrach są niemal identyczne, można przyjąć, że populacja nie odbiega znacząco od stanu równowagi Hardy’ego-Weinberga.

Tabela 2. Heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana w populacji wilka w Tatrach.

<b>Locus</b>	<b>Liczebność próby N</b>	<b>Heterozygotyczność obserwowana <math>H_o</math></b>	<b>Heterozygotyczność oczekiwana <math>H_e</math></b>	<b>Indeks wsobności F</b>
<b>FH2001</b>	41	0,683	0,676	-0,010
<b>FH2087</b>	41	0,805	0,755	-0,066
<b>FH2096</b>	41	0,634	0,608	-0,043
<b>PEZ17</b>	40	0,825	0,702	-0,176
<b>FH2010</b>	41	0,488	0,449	-0,087
<b>FH2017</b>	40	0,750	0,645	-0,162
<b>FH2137</b>	41	0,732	0,804	0,090
<b>vWF</b>	40	0,575	0,634	0,093
<b>FH2088</b>	42	0,571	0,616	0,072
<b>FH2140</b>	42	0,524	0,690	0,240
<b>FH2054</b>	38	0,737	0,829	0,111
<b>FH2161</b>	41	0,732	0,678	-0,079
<b>CPH5</b>	41	0,415	0,443	0,064
<b>Średnia</b>	40,692	0,652	0,656	0,004
<b>SE</b>	0,286	0,035	0,032	0,033

Dla zbadania poziomu ewentualnego chowu wsobnego u wilków, obliczono współczynnik wsobności (F), który definiuje prawdopodobieństwo, że osobnik ma w określonym locus dwa allele, które niedawno oddzieliły się od tego samego, wspólnego przodka. U wilków z Tatr współczynnik wsobności był bardzo niski i dla wszystkich analizowanych markerów wynosił średnio 0,004 (Tabela 2). Parametr ten był jednym z najniższych notowanych dotychczas w dzikich populacjach tych drapieżników. Pokazuje to, że wilki w Tatrach mają wystarczającą liczbę niespokrewnionych osobników, z którymi mogą się krzyżować bez zagrożenia wsobnością genetyczną.

## 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 (Czarnomska i in. 2013, Hulva i in. 2018). 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 (Tabela 3), 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 (Tab. 3).

Tabela 3. Różnorodność genetyczna, heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana, w oparciu o 11 markerów mikrosatelitarnych, u wilków z różnych regionów Polski w latach 2001-2009 (wg Czarnomskiej i in. 2013).

Region	Średnia liczba alleli	Heterozygotyczność obserwowana $H_o$	Heterozygotyczność oczekiwana $H_e$
Bieszczady i Pogórze Dynowskie	4,2	0,52	0,65
Beskid Niski i Sądecki	4,6	0,58	0,64
Gorce, Tatry, Beskid Żywiecki i Śląski	4,4	0,56	0,63
Roztocze	4,5	0,52	0,67
Lasy Parczewskie, Sobiborskie i Włodawskie	4,6	0,54	0,67
Puszcza Knyszyńska i Białowieska oraz Lasy Mielnickie	4,2	0,54	0,65
-Dolina Biebrzy	3,9	0,51	0,63
Puszcza Augustowska	4,3	0,51	0,65
Puszcza Romincka i Borecka	4,0	0,45	0,63
Puszcza Piska	4,5	0,55	0,69
Lasy Napiwodzko-Ramuckie	4,7	0,48	0,66
Zachodnia Polska oraz niemieckie Łużyce	4,8	0,52	0,69

Nowsze badania nad wilkami z Wigierskiego Parku Narodowego (próby zebrane w latach 2015-2017, 13 markerów mikrosatelitarnych) 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).

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 (Tab. 4).

Tabela 4. Różnorodność genetyczna, heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana, w oparciu o markery mikrosatelitarne, u wilków z różnych regionów Europy (wg Hindrikson i in. 2017).

<b>Kraj</b>	<b>Średnia liczba alleli</b>	<b>Heterozygotyczność obserwowana Ho</b>	<b>Heterozygotyczność oczekiwana He</b>
Rosja	4,7	0,63	0,64
Szwecja i Norwegia	3,7	0,59	0,55
Finlandia	6,0	0,62	0,68
Łotwa	6,9	0,71	0,73
Estonia	7,6	0,76	0,72
Litwa	6,9	0,69	0,71
Niemcy	5,4	0,57	0,56
Włochy	4,7	0,56	0,58
Chorwacja	5,4	0,63	0,69
Grecja i Bułgaria	6,7	0,69	0,73
Hiszpania	5,5	0,52	0,65
Czechy i Słowacja	4,1	0,58	0,66



## Literatura

- BLANCO J.C., CORTÉS Y. 2012. Surveying wolves without snow: a critical review of the methods used in Spain. *Hystrix It. J. Mammal.* 23, 1: 35–48.
- BOITANI L., ALVAREZ F., ANDERS O., ANDREN H., AVANZINELLI E., BALYS V., BLANCO J.C., BREITENMOSE U., CHAPRON G., CIUCCI P., DUTSOV A., GROFF C., HUBER D., IONESCU O., KNAUER F., KOJOLA I., KUBALA J., KUTAL M., LINNELL J., MAJIC A., MANNIL P., MANZ R., MARUCCO F., MELOVSKI D., MOLINARI A., NORBERG H., NOWAK S., OZOLINS J., PALAZON S., POTOCNIK H., QUENETTE P.-Y., REINHARDT I., RIGG R., SELVA N., SERGIEL A., SHKVYRIA M., SWENSON J., TRAJCE A., VON ARX M., WOLFL M., WOTSCHIKOWSKY U., ZLATANOVA D. 2015. Key actions for large carnivore populations in Europe. Report to DG Environment. Institute of Applied Ecology, Rome.
- CZARNOMSKA S.D., JĘDRZEJEWSKA B., BOROWIK T., NIEDZIAŁKOWSKA M., STRONEN A.V., NOWAK S., MYŚLAJEK 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. *Conserv. Genet.* 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., MYŚLAJEK R.W., NOWAK S., PILOT M., RANDI E., REINHARDT I., ŚMIETANA W., SZEWCZYK M., TABERLET P., VILÁ C., MUÑOZ-FUENTES V. 2016. Decades of population genetic research call for harmonization of molecular markers: the grey wolf, *Canis lupus*, as a case study. *Mammal Rev.* 46: 44–59.
- DISERENS T.A., BOROWIK T., NOWAK S., SZEWCZYK M., NIEDŹWIECKA N., MYŚLAJEK R.W. 2017. Deficiencies in Natura 2000 for protecting recovering large carnivores: A spotlight on the wolf *Canis lupus* in Poland. *PLoS One* 12(9): e0184144.
- DUFFIELD J.W., PATTERSON D.A., NEHER C.J. 2008. Wolf recovery in Yellowstone Park visitor attitudes, expenditures, and economic impacts. *Yellowstone Sc.* 16: 20–25.

- 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. *Mammal. Gen.* 7: 359–362.
- FREDHOLM M., WINTERØ A.K. 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammal. Gen.* 6: 11–18.
- GALAVERNI M., PALUMBO D., FABBRI E., CANIGLIA C., GRECO C., RANDI E. 2012. Monitoring wolves (*Canis lupus*) by non-invasive genetics and camera trapping: a small-scale pilot study. *Eur. J. Wildl. Res.* 58: 47–58.
- 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. *Biol. Rev.* 92: 1601–1629.
- HULVA P., ČERNÁ BOLFIKOVÁ B., WOZNICOVÁ V., JINDŘICHOVÁ M., BENEŠOVÁ M., MYŚLAJEK R.W., NOWAK S., SZEWCZYK M., NIEDŹWIECKA N., FIGURA M., HÁJKOVÁ A., SÁNDOR A.D., ZYKA V., ROMPORTL D., KUTAL M., FINĎO S., ANTAL V. 2018. Wolves at the crossroad: fission-fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe *Diver. Distrib.* 24: 179–192.
- JAMROZY G. (Ed.). 2015. Ssaki polskich parków narodowych. Drapieżne, kopytne, zajęczaki, duże gryzonie. Instytut Bioróżnorodności Leśnej Wydział Leśny UR, Magurski Park Narodowy, Kraków–Krempna.
- KALINOWSKI S.T., TAPER M.L., MARSHALL T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099–1106.
- KONOVALOV D.A., MANNING C., HENSHAW M.T. 2004. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Mol. Ecol. Notes* 4: 779–782
- KUIJPER D.P.J., DE KLEINE C., CHURSKI M., VAN HOOFT P., BUBNICKI J., JEŃDRZEJEWSKA B. 2013. Landscape of fear in Europe: wolves affect spatial patterns of ungulate browsing in Białowieża Primeval Forest, Poland. *Ecography* 36: 1–13.

- LAUNDRÉ J.W., HERNÁNDEZ L., RIPPLE W.F. 2010. The landscape of fear: ecological implications of being afraid. *Open Ecol. J.* 3: 1–7.
- 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. *Sci. Rep.* 7: 41730.
- Millennium Ecosystem Assessment. 2003. *Ecosystems and Human Well-Being: A Framework for Assessment*. Island Press, Washington.
- MILLER B.J., HARLOW H.J., HARLOW T.S., BIGGINS D., RIPPLE W.J. 2012. Trophic cascades linking wolves (*Canis lupus*), coyotes (*Canis latrans*), and small mammals. *Can. J. Zool.* 90: 70–78.
- MYSŁAJEK R.W., NOWAK S. 2014. Podręcznik najlepszych praktyk w ochronie wilka, rysia i niedźwiedzia brunatnego. CKPŚ, Warszawa.
- NEFF M.W., BROMAN K.W., MELLERSH C.S., RAY K., ACLAND G.M., ARUIRRE G.D., ZIEGLE 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., MYSŁAJEK R.W. 2007. Żeby chronić trzeba znać – nowoczesne metody badań i monitoringu rzadkich gatunków ssaków w lasach. *Studia Mat. Centr. Eduk. Przyr.–Leśn.* 2–3, 16: 438–445.
- NOWAK S., MYSŁAJEK R.W. 2016. Wolf recovery and population dynamics in Western Poland, 2001–2012. *Mammal Res.* 61: 83–98.
- NOWAK S., MYSŁAJEK R.W. 2017. Response of the wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) population to various management regimes at the edge of its distribution range in Western Poland, 1951–2012. *Appl. Ecol. Envir. Res.* 15, 3: 187–203.
- NOWAK S., MYSŁAJEK 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 zool.* 57: 392–402.
- 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., MYSŁAJEK R.W. 2018. Monitoring wilków (*Canis lupus*) z wykorzystaniem fotopułapek i analiz

genetycznych w Wigierskim Parku Narodowym, 2013-2017. Przegląd Przyrodniczy 29 (1): 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. Anim. Genet. 25: 122.

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 Res. 24: 3189–3194.

WOLSAN M., BIENIEK M., BUCHALCZYK T. 1992. The history of distributional and numerical changes of the wolf *Canis lupus* L. in Poland. In: BOBEK B., PERZANOWSKI K., REGELIN W.L. (Eds.). Global trends in wildlife management. Trans. 18th IUGB Congress, Krakow 1987. Wyd. Świat Press, Krakow-Warszawa: 375–380.

Aneks 1. Osobniki wyodrębnione na podstawie analiz genetycznych z wykorzystaniem 13 loci mikrosatelitarnych w Tatrach.

osobnik ID	Nr próby	status	płeć	FH2001	FH2007	FH2096	PEZ17	FH2010	FH2017	FH2137	vWF	FH2088	FH2140	FH2054	FH2161	CPH5													
TTR02_f	TTR02, TTR01, BZ73	Polska, dyspersja z Beskidu Żywieckiego	xx	148	148	240	248	92	100	193	201	221	229	256	264	159	163	154	160	117	129	145	145	140	140	232	236	111	111
TTR04_f	TTR04, TTR22	TPN	xx	140	144	236	248	96	100	193	209	229	229	256	268	177	181	160	160	117	117	129	129	136	168	240	244	111	111
TTR05_m	TTR05, TTR08, TTR9	TPN	xy	144	144	236	248	92	96	193	209	225	229	256	260	163	177	160	160	117	117	129	129	136	168	240	244	111	113
TTR16_f	TTR16, TTR99, TTR122, TTR123	TPN	xx	144	144	228	236	96	96	193	193	229	229	256	256	163	181	160	160	117	129	129	129	168	172	236	240	111	113
TTR18_m	TTR17, TTR18	TPN	xy	144	144	228	248	96	100	193	209	225	229	256	260	163	177	160	160	117	129	129	129	136	168	236	244	111	111
TTR20_f	TTR20	TPN	xx	140	148	236	248	92	96	193	209	229	229	256	268	177	181	160	160	117	129	129	129	136	168	236	244	111	111
TTR33_f	TTR33, TTR39, TTR46, TTR120, TTR121	TPN	xx	144	144	228	248	96	100	193	209	225	229	256	268	177	181	160	160	117	129	129	129	136	168	236	244	111	111
TTR36_f	TTR36	TPN	xx	144	144	224	0	92	96	193	209	225	0	256	264	181	181	160	0	117	129	129	149	172	172	248	248	111	111
TTR41_m	TTR41	TPN	xy	140	144	236	248	96	100	193	209	225	229	256	268	177	181	160	160	117	129	129	129	136	176	240	244	111	113
TTR42_f	TTR42, TTR44	TPN	xx	144	144	228	248	96	100	193	209	229	229	256	260	177	181	160	160	117	129	129	129	136	168	240	244	111	111
TTR45_f	TTR45, TTR115	TPN	xx	144	144	236	248	92	96	193	209	225	229	256	264	181	181	160	160	117	129	129	129	136	172	240	244	111	111
TTR47_m	TTR47, TTR30	TPN	xy	140	144	248	248	92	100	209	209	225	229	260	268	177	177	160	160	117	117	129	129	136	136	244	244	111	111
TTR116_f	TTR116	TPN	xx	136	148	232	248	96	96	193	209	225	229	256	264	157	171	136	160	117	117	129	149	140	148	240	244	111	111
TTR126_f	TTR126	TPN	xx	136	148	236	248	96	96	201	209	225	229	256	264	163	171	136	160	117	117	149	149	148	152	240	244	111	111
TTR100_f	TTR100	TPN	xx	136	136	232	248	92	96	193	209	225	229	0	0	163	163	136	160	117	117	129	149	152	168	240	244	111	111
TTR51_f	TTR51, TTR86,	Słowacja	xx	136	144	240	240	96	100	193	193	229	229	256	256	177	177	154	166	125	129	121	145	140	152	240	240	111	111

		TR104																													
TTR52_f	TTR52	Słowacja	xx	144	148	232	240	92	104	193	201	225	229	256	264	163	171	136	160	125	129	129	149	144	168	240	240	113	115		
TTR53_f	TTR53	Słowacja	xx	136	148	236	248	92	96	201	209	225	229	256	264	163	171	136	160	117	117	149	149	140	148	240	244	111	111		
TTR90_m	TTR90	Słowacja	xy	136	144	240	248	92	96	201	209	229	229	264	264	167	177	160	160	117	125	149	149	0	0	236	240	111	111		
TTR108_m	TTR108	Słowacja	x	144	148	232	240	92	104	193	205	229	229	256	264	157	157	136	166	117	125	145	149	168	0	240	244	111	113		
TTR110_m	TTR110, TTR111	Słowacja	xy	144	148	236	248	92	104	193	205	229	229	260	264	157	163	136	136	117	125	145	149	144	148	240	240	111	115		
TTR131_m	TTR131	Słowacja	xy	144	148	232	236	96	96	193	205	225	225	256	264	163	171	136	136	117	129	129	129	144	152	240	240	111	111		
TTR132_f	TTR132	Słowacja	xx	144	148	236	248	96	96	193	201	229	229	260	264	157	163	160	166	117	117	129	145	144	168	240	240	113	115		
TTR133_?	TTR133	Słowacja	bd	0	0	236	240	92	104	193	0	229	229	256	264	159	163	136	0	117	117	129	149	144	0	240	240	113	0		
TTR143_f	TTR143	Słowacja	xx	136	144	244	248	96	96	0	0	221	229	264	264	163	177	160	160	117	125	129	149	152	0	240	0	111	111		
TTR88_m	TTR88, TTR89	Słowacja	xy	136	144	240	240	96	96	193	193	229	229	256	256	177	177	136	154	129	129	121	149	140	152	236	240	111	115		
TTR106_f	TTR102, TTR106	Słowacja	xx	136	144	240	244	92	100	193	209	229	229	256	264	163	177	160	166	117	125	121	149	144	152	236	240	111	111		
TTR138_f	TTR138	Słowacja	xx	144	144	236	240	96	96	193	201	225	229	256	256	159	177	154	166	129	129	121	145	140	152	224	236	111	115		
TTR142_m	TTR142	Słowacja	xy	144	148	232	240	92	104	193	205	229	229	264	0	157	163	136	166	117	125	145	149	144	152	240	244	111	113		
TTR58_f	TTR58	Słowacja	xx	136	144	236	236	96	96	193	193	229	229	256	268	177	177	136	154	129	129	121	121	140	140	236	240	111	115		
TTR61_f	TTR61	Słowacja	xx	136	144	236	236	96	96	193	201	229	229	256	256	163	177	136	166	129	129	121	121	140	140	236	240	111	115		
TTR92_m	TTR92	Słowacja	xy	148	148	248	248	96	96	205	209	221	229	256	264	179	181	136	160	125	129	129	149	140	140	224	236	111	115		
TTR102_f	TTR102	Słowacja	xx	136	136	236	240	92	100	193	209	229	229	256	264	163	0	160	166	117	125	121	149	144	152	236	240	111	111		
TTR80_m	TTR80	Słowacja	xy	136	148	236	248	96	96	209	209	225	225	264	264	163	171	136	136	117	117	149	149	140	152	244	248	111	111		
TTR81_f	TTR81	Słowacja	xx	136	148	232	248	92	96	193	201	229	229	256	260	157	163	160	160	117	117	129	149	148	168	240	240	111	111		
TTR87_m	TTR87	Słowacja	xy	136	144	240	248	92	96	193	201	229	229	256	264	177	177	154	160	125	125	121	149	152	152	240	240	111	111		
TTR109_m	TTR109	Słowacja	xy	140	140	228	228	96	96	197	201	221	225	260	264	163	163	130	136	113	117	129	129	152	164	244	248	115	115		
TTR24_m	TTR24	Słowacja	xy	140	144	248	248	92	100	205	209	225	229	264	264	165	177	160	166	117	117	129	129	136	140	232	240	111	111		
TTR25_m	TTR25	Słowacja	xy	136	144	236	240	96	96	193	205	229	229	256	256	159	177	154	160	125	129	121	145	140	140	224	240	113	115		
TTR26_m	TTR26	Słowacja	xy	144	148	236	248	96	96	205	205	225	229	256	264	179	179	160	166	113	129	121	149	140	140	240	240	111	113		
TTR32_f	TTR32	Słowacja	xx	136	144	236	240	0	0	201	205	225	229	256	264	165	179	160	160	125	129	121	149	140	140	224	240	111	113		
TTR40_f	TTR40	Słowacja	xx	144	148	240	248	96	104	193	201	225	229	260	264	163	171	160	166	117	117	129	145	144	152	240	244	113	115		