

# Wykorzystanie metod molekularnych do oceny liczebności i zróżnicowania genetycznego cietrzewi *Tetrao tetrix* w Tatrzańskim Parku Narodowym

## RAPORT

(W RAMACH UMOWY nr ZP/455/2019 z dnia 03.08.2019 roku)

**Dofinansowano ze środków funduszu leśnego przekazanych przez Lasy Państwowe**



Robert Rutkowski

*Muzeum i Instytut Zoologii PAN*

## *Wprowadzenie*

Raport przedstawia wyniki analiz genetycznych 150 prób biologicznych, w cietrzewia. Wszystkie próby zebrano z terenu Tatrzańskiego Parku Narodowego.

## *Metodyka badań*

### **Procedury laboratoryjne**

DNA było izolowane z odchodów i piór zgodnie z metodyką opisaną przez Rutkowskiego et al. (2005, 2012, 2017). Izolacja DNA była przeprowadzana w oddzielnym pomieszczeniu, przeznaczonym tylko do izolacji z tzw. „trudnych materiałów”. Przed każdą izolacją pomieszczenie oraz pipety automatyczne były wyjaławiane światłem UV. Izolacja była przeprowadzana w zestawach po 10 prób, z jedną tzw. „próbą ślepą”, zawierającą wszystkie odczynniki i poddawana wszystkim procedurom, ale bez materiału biologicznego. Powyższe procedury pozwoliły ograniczyć prawdopodobieństwo kontaminacji materiału, lub ewentualne jej wykrycie na etapie PCR (amplifikacja „próby ślepej”). Izolacja z odchodów przeprowadzana była przy użyciu zestawu NucleoSpin Soil (firma Machery-Nagel), izolacja z piór przeprowadzana była przy użyciu zestawu GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA purification Kit (firmy EURX).

W przypadku cietrzewia analizowano 8 markerów mikrosatelitarnych: TUT1, TUT2, TUT3, TUT4, opisane przez Segelbachera et al. (2000), TTT1, BG12, BG16 i BG18 (Caizergues et al. [2001]; Piertney i Höglund [2001]).

Markery mikrosatelitarne amplifikowano metodą multiplex-PCR w dwóch 'miksach' reakcyjnych: MIX1: BG16, TTT1, TUT2, BG12; MIX2: TUT1, TUT4, TUT3, BG18. Mieszanina reakcyjna dla piór zawierała 1,5µl mieszaniny starterów dla każdego markera w stężeniu 2pmol/µl; 7,5µl PCR

MasterMix (QIAGEN); 1,25  $\mu$ l Q-solution, 2,75  $\mu$ l wody do PCR, oraz 2  $\mu$ l ekstraktu DNA. Dla odchodów dodatkowo zawierała 0,7  $\mu$ l antyinhibitora PCR (DNA Gdańsk) i zwiększoną ilość ekstraktu DNA (3  $\mu$ l). Reakcję przeprowadzano w następujących warunkach: 15 min w 95°C; 40 cykli: 30 s w 94°C, 90 s w 57°C; 90 s w 72°C; 1 cykl: 30 s w 94°C, 90 s w 57°C; 10 min. w 72°C.

Analizę genotypów była przeprowadzana z wykorzystaniem sekwenatora automatycznego CEQ8000.

**Dla każdej próby nieinwazyjnej reakcję PCR powtarzano dwukrotnie. Produkty z każdej reakcji analizowano niezależnie na sekwenatorze. Sprawdzano zgodność uzyskanych genotypów. Jeśli występowały różnice między genotypami z poszczególnych odczytów, reakcję PCR powtarzano po raz trzeci. Jeśli genotypy ze wszystkich trzech reakcji różniły się bardzo wyraźnie próba była eliminowana z dalszych analiz, jako niewiarygodna. W przypadku niewielkich różnic, możliwych do wytłumaczenia zjawiskami typowymi dla genetycznych analiz prób nieinwazyjnych ('odrzućcie alleliczne', 'fałszywe allele', brak amplifikacji), na podstawie trzech odczytów konstruowano genotyp konsensusowy. Takie podejście powinno zagwarantować rzetelność uzyskiwanych danych populacyjnych.**

Na podstawie uzyskanych wyników opracowano mikrosatelitarne profile genetyczne każdej próby nieinwazyjnej. Uzyskane profile porównano, identyfikując próby pochodzące od tych samych osobników. Analizę wykonano przy użyciu programu GenAlEx version 6.501. Wyniki weryfikowano 'ręcznie'. Profile genetyczne klasyfikowano jako jednakowe, jeśli były one identyczne w co najmniej 80% spośród analizowanych loci mikrosatelitarnych, a istniejące różnice można było wytłumaczyć opisanymi w literaturze błędami

technicznymi, związanymi z analizami markerów mikrosatelitarnych w próbach nieinwazyjnych (e.g. Taberlet et al. 1999).

## *Wyniki*

Spośród 150 analizowanych prób cietrzewia wiarygodne genotypy mikrosatelitarne uzyskano w przypadku 68 prób. W materiale dostarczonym do badań stwierdzono występowanie 32 genotypów unikatowych (=osobników cietrzewia). Siedemnaście z nich stwierdzono w więcej niż jednej, niezależnie zebranej próbie nieinwazyjnej, natomiast 15 genotypów unikatowych stwierdzono w pojedynczych próbach. Wskazuje to na obecność minimum 32 żywych osobników cietrzewia na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego w latach 2018–20129 roku ( $MNA = 32$ ). Podczas klasyfikowania prób pod względem genotypów unikatowych, dopuszczano różnicę w jednym spośród ośmiu badanych loci mikrosatelitarnych, pod warunkiem, że można ją było wyjaśnić jednym z typowych błędów, powstających podczas genotypowania mikrosatelitarnego prób nieinwazyjnych [Taberlet 1999].

Unikatowe genotypy, stwierdzone na terenie TPN ( $N = 32$ ), potraktowano jako próbę z populacji tatrzańskiej. Wyznaczone na tej podstawie miary zmienności genetycznej porównano z danymi z innych krajowych populacji cietrzewia (Tabela 1). Stwierdzono, że populacja z TPN charakteryzuje się wysokimi wskaźnikami zmienności genetycznej. Wskaźniki oparte na liczbie alleli ( $A$ ,  $R$ ) były najwyższe w tej populacji, a wyższą heterozygotyczność stwierdzono tylko w Puszczy Knyszyńskiej (Tabela 1)

Tabela 1. Charakterystyka ogólnego poziomu zmienności genetycznej w populacjach cietrzewia z Tatrzańskiego Parku Narodowego (TPN), Sudetów (SUD), Kotliny Orawsko-Nowatorskiej (KON), Puszczy Knyszyńskiej (KNY), Puszczy Kurpiowskiej (KUR) oraz Biebrzańskiego Parku Narodowego (BIE). Liczba prób ( $N$ ), średniej liczba alleli mikrosatelitarnych na locus ( $N_a$ ), różnorodności allelicznej ( $A$ ), bogactwo alleliczne ( $R$ ), allele unikatowe (Priv.) oraz heterozygotyczność oczekiwana ( $HE$ ).

Populacje	N	Na	A	R	Priv.	HE
<b>TPN</b>	21	4.667	6.833	5.998	0.667	0.731
<b>SUD</b>	30	3.833	5.5	4.626	0.167	0.608
<b>KON</b>	15	4.000	4.833	4.712	0	0.606
<b>KNY</b>	20	5.500	6.5	6.011	0.667	0.76
<b>KUR</b>	17	3.333	3.833	3.671	0	0.53
<b>BIE</b>	15	4.000	6	5.808	0.333	0.636

Analiza zróżnicowania genetycznego między populacją z TPN i pozostałymi krajowymi populacjami (Rutkowski et al. 2018) sugeruje, że cietrzewie tatrzańskie są najbardziej zbliżone pod względem genetycznym do populacji z Kotliny Orawsko-Nowotarskiej i Puszczy Knyszyńskiej (Tabela 2). Największe wartości  $F_{st}$  stwierdzono dla porównań TPN z populacją z Sudetów. Wskazuje to, że populacja z TPN powinna być zaliczona do dużej grupy genetycznej wyróżnionej przez Rutkowskiego et al. (2018) obejmującej populacje z północno-wschodniej Polski oraz podgórze karpackiego. Uzyskane wyniki potwierdziły więc odrębność genetyczną populacji cietrzewia z Sudetów.

Tabela 2. Dystans genetyczny pomiędzy populacjami z Tatrzańskiego Parku Narodowego (TPN), Sudetów (SUD), Kotliny Orawsko-Nowotarskiej (KON), Puszczy Knyszyńskiej (KNY), Puszczy Kurpiowskiej (KUR) oraz Biebrzańskiego Parku Narodowego (BIE)

	<b>SUD</b>	<b>KON</b>	<b>KNY</b>	<b>KUR</b>	<b>BIE</b>
<b>TPN</b>	0.17	0.11	0.08	0.16	0.12
<b>SUD</b>		0.24	0.16	0.28	0.19
<b>KON</b>			0.12	0.19	0.15
<b>KNY</b>				0.17	0.10
<b>KUR</b>					0.12

## Cytowana literatura

1. 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
2. Paekal R., Smouse P. E. 2001. GenAlEx V6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>
3. Piertney S. B., Höglund J. 2001. Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes* 1: 303–304
4. 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.
5. Rutkowski R., Keller M., Jagołkowska 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
6. Rutkowski R., Pałucki A., Dulisz B., Ciach M., Nowak-Życzyńska Z., Kowalewska K. 2018. Conservation genetics of the Black Grouse in Poland — distribution of genetic diversity among the last populations. *Acta Ornithologica* 53: 181–204
7. 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