

**Wykorzystanie metod molekularnych do oceny
liczebności, śmiertelności i rozrodczości
głuszców *Tetrao urogallus*
w Tatrzańskim Parku Narodowym.**

RAPORT

(W RAMACH UMOWY nr Nr ZP/456/2019 z dnia 03.08.2019 r)

Robert Rutkowski

Muzeum i Instytut Zoologii PAN

Dofinansowano ze środków funduszu leśnego przekazanych przez Lasy Państwowe



WARSZAWA, 15.11.2019

W ramach umowy nr Nr ZP/456/2019 z dnia 03.08.2019 roku do badań genetycznych dostarczono 100 prób nieinwazyjnych, zebranych na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego (TPN) w 2019 roku. Wszystkie próby poddano procesowi ekstrakcji DNA i amplifikacji 9 markerów molekularnych - sekwencji mikrosatelitarnych. Wiarygodne genotypy mikrosatelitarne (udana amplifikacja co najmniej 7 spośród 9 badanych markerów; idealna bądź wysoka powtarzalność uzyskiwanych genotypów w 5 kolejnych reakcjach PCR; zakres wielkości alleli charakterystycznych dla badanego gatunku) uzyskano w przypadku 66 prób (66%). Wykorzystując genotypy mikrosatelitarne przeprowadzono następujące analizy: (i) określono, które próby pochodziły od tych samych osobników. Przyjmowano, że zgodność genotypów w co najmniej 8 spośród 9 badanych markerów mikrosatelitarnych jest dowodem, że próba pochodzi od tego samego osobnika (ii) oszacowano poziom zmienności genetycznej populacji głuszca z TPN.

Zastosowane metody molekularne

DNA było izolowane z odchodów zgodnie z metodyką opisaną przez Rutkowskiego et al. (2005, 2012). 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)

Analizowano 9 markerów mikrosatelitarnych: Tut1, TuT2, TuT3, TuT4 (powtórzenia czteronukleotydomowe) oraz TuD4 (powtórzenia dwunukleotydomowe) opisane przez Segelbachera et al. (2000) oraz 6 czteronukleotydomowych markerów mikrosatelitarnych opisanych dla cietrzewia *Tetrao tetrix* (Caizergues et al. [2001]; Piertney i Höglund [2001]): TTT1, Bg12, Bg16 i Bg18.

Markery mikrosatelitarne amplifikowano metodą multiplex-PCR w trzech 'miksach' reakcyjnych: MIX1: Bg16, TTT1, TUT2, Bg12; MIX2: TuT1, TuD4, TUT4, TUT3, Bg18. Mieszanina reakcyjna zawierała 1,5µl mieszaniny starterów dla każdego markera w stężeniu 2pmol/µl; 7,5µl PCR MasterMix (QIAGEN); 2,7 µl wody do PCR, 0,3 µl antyinhibitora PCR (DNA Gdańsk) oraz 3µl ekstraktu DNA. 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.

Statystyczna analiza wyników

Analizy wyników genotypowania mikrosatelitarnego przeprowadzono w kilku etapach: (i) **zidentyfikowano próby o jednakowych genotypach** i, przyjmując założenie, że próby te pochodzą od tych samych osobników, określono liczbę genotypów unikatowych w badanej populacji. Powyższe analizy przeprowadzono za pomocą programu GenAEx v. 6 (Peakall i Smouse [2001]); (ii) **dla wszystkich genotypów unikatowych**, na podstawie wskaźników polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych, określono poziom zmienności genetycznej badanej populacji: oszacowano liczbę alleli w loci (różnorodność alleliczną, A), bogactwo alleliczne (*R sensu* Petit et al. [1998]), efektywną liczbę alleli (N_e), 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 oczekiwanej od obserwowanej (HWE) testem bezpośrednim Fishera, jak również wartość i istotność wskaźnika zimbredowania F_{IS} . W powyższych analizach wykorzystano program GenAEx, FSTAT v. 2.9.3 (Goudet 2001) i Genepop on the Web version 4.0.10 (Raymond i Rousset [1995]; Rousset [2008]).

Wyniki

Wiarygodne genotypy udało się uzyskać w przypadku 66 prób z 2019 roku (Tabela 1). Stwierdzono występowanie 28 genotypów unikatowych, z czego 18 genotypów stwierdzono w więcej niż 1 próbie, a 10 genotypów występowało tylko w pojedynczych próbach. Genotypy unikatowe zamieszczono w Tabeli 2. Wyniki wskazują więc, że na terenie badań stwierdzono występowanie 28 osobników głuszca.

W badanej populacji wszystkie analizowane markery charakteryzowały się niskim polimorfizmem (Tabela 3). Liczba alleli w locus (A) zawierała się w przedziale 2–5, co wskazuje, że poziom polimorfizmu w poszczególnych loci był bardzo zbliżony. Większość spośród 9 analizowanych loci mikrosatelitarnych wykazało istotne odchylenia od równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE) (Tabela 3). Ogólny test na HWE (dla wszystkich loci w całej populacji), wykazał, że populacja nie znajduje się w równowadze genetycznej HWE (Tabela 3). Średnia liczba alleli i średnia heterozygotyczność obserwowana (Tabela 3) wskazują, że populacja z TPN jest stabilna, a w porównaniu z innymi krajowymi populacjami głuszca (Rutkowski et al. 2016), charakteryzuje się średnim poziomem zmienności genetycznej.

Tabela 1. Wykaz analizowanych prób i zidentyfikowanych genotypów. G1–G28 — genotypy; 0 — analiza nieudana z powodu złej jakości DNA

Nr laboratoryjny	Data	Lokalizacja	Rodzaj próby	Genotyp
Tu6656	15.02.2019	Roztocka Czuba	O	G1
Tu6657	15.02.2019	Roztocka Czuba	O	G1
Tu6658	18.02.2019	Jaferowy Grzbiet	O	G2
Tu6659	18.02.2019	Jaferowy Grzbiet	O	G2
Tu6660	19.02.2019	Herbik	O	G3
Tu6661	19.02.2019	Herbik	O	G3
Tu6662	19.02.2019	Pańszczycka Skałka	O	G4
Tu6663	19.02.2019	Pańszczycka Skałka	O	G4
Tu6664	19.02.2019	Dubrawiska	O	G5
Tu6665	19.02.2019	Dubrawiska	O	G5
Tu6666	19.02.2019	Dubrawiska	O	G5
Tu6667	19.02.2019	Łasicowa Woda	O	G6
Tu6668	19.02.2019	Butorów	O	G7
Tu6669	20.02.2019	Dol. Sucha Kondradzka	O	G8
Tu6670	20.02.2019	Dol. Sucha Kondradzka	O	G8
Tu6671	25.02.2019	Bobrowiec	O	G9
Tu6672	25.02.2019	Bobrowiec	O	G9
Tu6673	25.02.2019	Hrubas	O	G10
Tu6674	27.02.2019	Karczmiszko	O	0
Tu6675	04.03.2019	Dubrawiska	O	G5
Tu6676	04.03.2019	Dubrawiska	O	G5
Tu6677	08.03.2019	Kondradzki Wierch	O	G11
Tu6678	08.03.2019	Dol. Sucha Kondradzka	O	G8
Tu6679	08.03.2019	Poł. Zbocze łopaty	O	0
Tu6680	08.03.2019	Poł. Zbocze łopaty	O	0
Tu6681	08.03.2019	Nadspady 1	O	G12
Tu6682	08.03.2019	Nadspady 1	O	G12
Tu6683	08.03.2019	Nadspady 1	O	0
Tu6684	08.03.2019	Nadspady 1	O	G12
Tu6685	08.03.2019	Nadspady 2	O	0
Tu6686	08.03.2019	Nadspady 3	O	G13
Tu6687	08.03.2019	Nadspady 4	O	0
Tu6688	08.03.2019	Nadspady 4	O	G13
Tu6689	08.03.2019	Nadspady 4	O	0
Tu6690	08.03.2019	Nadspady 4	O	G13
Tu6691	08.03.2019	Sucha Tomanowa 1	O	0
Tu6692	08.03.2019	Sucha Tomanowa 1	O	G14
Tu6693	08.03.2019	Sucha Tomanowa 1	O	G14
Tu6694	08.03.2019	Sucha Tomanowa 1	O	0
Tu6695	08.03.2019	Gąsienicowy las	O	G15
Tu6696	08.03.2019	Sucha Kondracka	O	G8

Tu6697	08.03.2019	Sucha Kondracka	O	G16
Tu6698	08.03.2019	Sucha Kondracka	O	G8
Tu6699	13.03.2019	Opalony/Kominiarski	O	0
Tu6700	14.03.2019	Roztocka Czuba	O	G17
Tu6701	14.03.2019	Roztocka Czuba	O	G1
Tu6702	14.03.2019	Roztocka Czuba	O	G1
Tu6703	14.03.2019	Roztocka Czuba	O	G18
Tu6704	20.03.2019	Stare Szalasiska	O	0
Tu6705	20.03.2019	Dubrawiska	O	G5
Tu6706	20.03.2019	Dubrawiska	O	G21
Tu6707	21.03.2019	Wierch Poroniec	O	G19
Tu6708	21.03.2019	Międzydrogi	O	G20
Tu6709	21.03.2019	Międzydrogi	O	G20
Tu6710	21.03.2019	Międzydrogi	O	0
Tu6711	21.03.2019	Goły Wierch 3	O	G23
Tu6712	21.03.2019	Goły Wierch 3	O	0
Tu6713	21.03.2019	Goły Wierch 3	O	G23
Tu6714	21.03.2019	Goły Wierch 3	O	G23
Tu6715	21.03.2019	Goły Wierch 4	O	0
Tu6716	21.03.2019	Goły Wierch 5	O	0
Tu6717	22.03.2019	Dubrawiska	O	G21
Tu6718	22.03.2019	Strzelecka Koleba	O	0
Tu6719	08.03.2019	Dolinka	O	0
Tu6720	29.03.2019	Grześ	O	0
Tu6721	29.03.2019	Grześ	O	0
Tu6722	01.04.2019	Las Gąsienicowy	O	0
Tu6723	02.04.2019	Łysa Skalka	O	0
Tu6724	02.04.2019	Łysa Skalka	O	G22
Tu6725	02.04.2019	Łysa Skalka	O	G22
Tu6726	02.04.2019	Goły Wierch	O	0
Tu6727	02.04.2019	Goły Wierch	O	G23
Tu6728	02.04.2019	Goły Wierch	O	G23
Tu6729	02.04.2019	Goły Wierch	O	G23
Tu6730	06.04.2019	Sucha Kondradzka - nartostrada	O	G8
Tu6731	04.04.2019	oddz. 86/87	O	0
Tu6732	04.04.2019	oddz. 87	O	0
Tu6733	10.04.2019	oddz. 19 Kośne?	O	0
Tu6734	14.04.2019	Rusinowa Polana	O	0
Tu6735	15.04.2019	Sucha Kondracka	O	G8
Tu6736	15.04.2019	Sucha Kondracka	O	G16
Tu6737	15.04.2019	Łopata	O	0
Tu6738	16.04.2019	Ptasiniec - suchy las	O	G24
Tu6739	16.04.2019	Ptasiniec - suchy las	O	0
Tu6740	16.04.2019	Ptasiniec - suchy las	O	G25
Tu6741	16.04.2019	Ptasiniec - suchy las	O	G24

Tu6742	16.04.2019	Ptasiniec - suchy las	O	G26
Tu6743	16.04.2019	Ptasiniec - miejsce fotopułapki	O	0
Tu6744	16.04.2019	Ptasiniec - miejsce fotopułapki	O	G24
Tu6745	16.04.2019	Ptasiniec - miejsce fotopułapki	O	G24
Tu6746	16.04.2019	Ptasiniec - miejsce fotopułapki	O	G26
Tu6747	16.04.2019	Ptasiniec - miejsce fotopułapki	O	0
Tu6748	16.04.2019	Żleb Krowiniec	O	G27
Tu6749	18.04.2019	oddz. 84/87 Las Wapienny Piec	O	0
Tu6750	19.04.2019	Wyżnia Uplazińska Równia	O	0
Tu6751	19.04.2019	Wyżnia Uplazińska Równia	O	0
Tu6752	25.04.2019	Sucha Kondracka	O	G16
Tu6753	02.04.2019	Królowy Grzbiet I	O	G28
Tu6754	02.04.2019	Królowy Grzbiet II	O	G28
Tu6755	04.2019	Moko54	O	0

Tabela 3. Genotypy unikatowe zidentyfikowane na podstawie polimorfizmu w 9 loci mikrosatelitarnych

	BG16		TTT1		TUT2		BG12		TUT1		TUD4		TUT4		TUT3		BG18	
G1	176	176	208	208	156	156	170	170	211	211	132	132	178	178	154	154	190	190
G2	172	172	204	216	164	164	146	158	211	215	0	0	170	178	150	166	190	190
G3	156	176	224	224	156	164	158	158	211	215	132	132	174	174	154	154	190	190
G4	172	176	208	216	156	164	0	0	211	211	168	168	174	178	150	154	194	198
G5	172	172	204	208	164	164	146	174	211	211	168	168	170	170	150	154	190	190
G6	176	176	204	208	156	164	146	170	215	215	132	168	170	182	0	0	190	194
G7	172	176	204	208	156	164	146	170	211	215	160	168	174	174	150	166	190	198
G8	172	176	204	208	156	164	158	158	215	215	132	168	170	178	150	154	190	190
G9	172	172	208	208	156	164	170	170	211	211	168	168	174	178	154	154	198	198
G10	0	0	208	216	164	164	146	158	211	215	168	168	170	174	150	154	190	194
G11	176	176	208	208	164	164	158	158	0	0	168	168	174	178	0	0	194	198
G12	172	172	208	208	156	156	170	170	0	0	132	132	178	178	154	154	194	194
G13	172	176	208	224	156	164	158	170	211	215	168	168	166	178	154	166	190	194
G14	156	176	208	224	164	164	158	170	211	215	132	168	174	174	154	166	190	194
G15	176	176	208	208	156	156	170	170	211	211	132	132	178	178	154	154	190	190
G16	172	172	204	216	164	164	146	158	211	215	0	0	170	178	150	166	190	190
G17	156	176	224	224	156	164	158	158	211	215	132	132	174	174	154	154	190	190
G18	172	176	208	216	156	164	0	0	211	211	168	168	174	178	150	154	194	198
G19	172	172	204	208	164	164	146	174	211	211	168	168	170	170	150	154	190	190
G20	176	176	204	208	156	164	146	170	215	215	132	168	170	182	0	0	190	194
G21	172	176	204	208	156	164	146	170	211	215	160	168	174	174	150	166	190	198
G22	172	176	204	208	156	164	158	158	215	215	132	168	170	178	150	154	190	190
G23	172	172	208	208	156	164	170	170	211	211	168	168	174	178	154	154	198	198
G24	0	0	208	216	164	164	146	158	211	215	168	168	170	174	150	154	190	194
G25	176	176	208	208	156	156	170	170	211	211	132	132	178	178	154	154	190	190
G26	172	172	204	216	164	164	146	158	211	215	0	0	170	178	150	166	190	190

G27	156	176	224	224	156	164	158	158	211	215	132	132	174	174	154	154	190	190
G28	172	176	208	216	156	164	0	0	211	211	168	168	174	178	150	154	194	198

Tabela 3. Charakterystyka ogólnego poziomu zmienności genetycznej w populacji głuszcza z terenu TPN na podstawie polimorfizmu 9 markerów mikrosatelitarnych. Uwzględniono tylko genotypy unikatowe.

Locus	N	A	Ne	H_O	H_E	HWE	F_{IS}
BG16	27	3	2,32	0,462	0,568	*	0.226*
TTT1	28	4	2,56	0,643	0,610		-0.017
TUT2	28	2	1,91	0,500	0,477		-0.011
BG12	26	4	2,99	0,538	0,666	*	0.229*
TUT1	24	2	1,95	0,500	0,486		0.015
TuD4	26	3	2,00	0,308	0,500	*	0.418*
TUT4	28	5	3,29	0,571	0,696	*	0.215
TUT3	24	3	2,32	0,667	0,569		-0.128
BG18	28	3	2,50	0,500	0,599	*	0.202
Średnia		3.22	2,43	0,521	0,575	*	0.132

N - liczba prób, w których udało się zamplifikować dany marker; *A* – różnorodność alleliczna [liczba alleli mikrosatelitarnych, występujących w badanym locus]; *Ne* – efektywna liczba alleli [hipotetyczna liczba alleli występujących z jednakową frekwencją, która dawałaby obserwowaną heterozygotyczność w danym locus]; *H_O* – heterozygotyczność obserwowana [poziom heterozygotyczności, zaobserwowany w locus]; *H_E* – heterozygotyczność oczekiwana [poziom heterozygotyczności, który powinien występować w locus przy danej liczbie alleli, jeśli populacja znajdowałaby się w równowadze Hardy'ego-Weinberga]; *HWE* – wynik testu bezpośredniego na równowagę Hardy'ego-Weinberga; *F_{IS}* – współczynnik inbredu [miara pokazująca wielkość i istotność odchylenia heterozygotyczności oczekiwanej od obserwowanej]; * - istotne odchylenie od równowagi Hardy'ego-Weinberga ($P < 0.05$) lub istotna wartość *F_{IS}* (korekta poziomu istotności dla porównań wielokrotnych metodą Bonferroniego, $P = 0.005$)

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. 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>
3. Kalinowski S. T. 2005. A computer program for performing rarefaction on measures of alleli diversity. *Molecular Ecology Notes* 5: 187–189
4. Paekal R., Smouse P. E. 2001. GenAlEx V6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. <http://www.anu.ed.au/BoZo/GenAlEx/>
5. Petit R. J., El Mousadik A., Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844–855
6. Piertney S. B., Höglund J. 2001. Polymorphic microsatellite DANN markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes* 1: 303–304
7. Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism, *Journal of Heredity* 86: 248–249
8. Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106
9. Rutkowski R., Niewęglowski H., Dziedzic R., Kmiec M., Goździewski J. 2005. Genetic variability of Polish population of the Capercaillie *Tetrao urogallus*. *Acta Ornithologica* 40: 27–34.
10. Rutkowski R., Keller M., Jagórkowska 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
11. Rutkowski R., Zawadzka D., Suchecka E., Merta D. 2016. Conservation genetics of the capercaillie in Poland — delineation of conservation units. *PLOS ONE*
12. 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
13. Weir B. S., Cockerham C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370

Warszawa, 15.11.2019