



Sfinansowano ze środków funduszu leśnego
Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasów Państwowych

**Ocena liczebności głuszca *Tetrao urogallus* na terenie
Tatrzańskiego Parku Narodowego, na podstawie analiz
genetycznych próbek odchodów i piór**

RAPORT

(W RAMACH UMOWY ZP/551/2016 Z DNIA 20.10.2016)

Robert Rutkowski

Muzeum i Instytut Zoologii PAN

WARSZAWA, 05.12.2016

W ramach umowy ZP/551/2016 z dnia 20.10.2016 do badań genetycznych dostarczono 157 próby nieinwazyjne (151 prób odchodów i 6 piór), zebranych na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego (TPN). 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 96 prób (61%). 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 GenAlEx 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 GenAlEx, 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 86 prób z 2016. Analizy genetyczne wykazały, że wśród 157 prób znajdowało się 9 odchodów pochodzących od innych gatunków niż głuszec (Tabela 1). Stwierdzono występowanie 38 genotypów unikatowych, z czego 18 genotypów stwierdzono w więcej niż 1 próbie (Tabela 2, genotypy G1–G18), a 20 genotypów (G19–G38) występowało tylko w pojedynczych próbach. Genotypy unikatowe zamieszczono w Tabeli 3. Wyniki wskazują więc, że na terenie badań stwierdzono występowanie 38 osobników głuszca.

W badanej populacji wszystkie analizowane markery charakteryzowały się polimorfizmem (Tabela 4). Liczba alleli w locus (A) zawierała się w przedziale 4–7, co wskazuje, że poziom polimorfizmu w poszczególnych loci był bardzo zbliżony. Dwa spośród 9 analizowanych loci mikrosatelitarnych wykazało istotne odchylenie od równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE), we wszystkich przypadkach wynikające z niedoboru heterozygot ($F_{IS} = 0.111$, $P < 0.05$; Tabela 4). Ogólny test na HWE (dla wszystkich loci w całej populacji), wykazał, że populacja nie znajduje się w równowadze genetycznej HWE , (Tabela 4). Jednakże usunięcie z analiz locus o najwyraźniejszym niedoborze heterozygot (TUT1, Tabela 4), spowodowało, że ani odchylenie od HWE ani współczynnik inbredu nie były istotne ($P > 0.05$; $F_{IS} = 0.033$, ns.). Średnia liczba alleli i średnia heterozygotyczność obserwowana (Tabela 4)

wskazują, że populacja z TPN jest stabilna i w porównaniu z innymi krajowymi populacjami głuszca (Rutkowski et al. 2016), charakteryzuje się wysokim poziomem zmienności genetycznej.

Tabela 1. Wykaz analizowanych prób i zidentyfikowanych genotypów. G1–G38 — genotypy; 0 — analiza nieudana z powodu złej jakości DNA; gat — odchody innego gatunku

Wyniki analizy	Nr laboratoryjny próby	Miejsce zbioru	Data zbioru
0	4229	Żabie, oddz. 47a	20.08.16
0	4230	Polana pod Uboczą	09.08.16
0	4231	Grześ	06.04.16
0	4232	Polana Waksmundzka	21.06.16
0	4233	Bobrowiec Hrubas	02.03.16
0	4234	Bobrowiec Hrubas	02.03.16
G12	4235	Bobrowiec Hrubas	02.03.16
G3	4236	Bobrowiec Mnichy	17.03.16
G3	4237	Bobrowiec Mnichy	17.03.16
0	4238	Bobrowiec W. K	17.03.16
0	4239	Bobrowiec W. K	17.03.16
0	4240	Bobrowiec W. K	17.03.16
G1	4241	Bobrowiec	31.03.16
G1	4242	Bobrowiec	31.03.16
G1	4243	Bobrowiec	31.03.16
G1	4244	Bobrowiec	31.03.16
G2	4245	Bobrowiec	31.03.16
G2	4246	Bobrowiec	31.03.16
0	4247	Bobrowiec	31.03.16
G12	4248	Bobrowiec	31.03.16
G2	4249	Bobrowiec	–
G19	4250	Bobrowiec J. żleb	31.03.16
G3	4251	Bobrowiec ch. regiel	31.03.16
G3	4252	Bobrowiec ch. regiel	31.03.16
gat	4253	Bobrowiec ch. regiel	31.03.16
0	4254	Bobrowiec W. K	31.03.16
G4	4255	Bobrowiec W. K	31.03.16
G4	4256	Bobrowiec W. K	31.03.16
0	4257	Bobrowiec żleb	31.03.16
0	4258	Sucha woda Stary Bór	24.02.16
0	4259	Sucha Woda	03.03.16
G13	4260	Czuba Roztocka	05.04.16
G20	4261	Czuba Roztocka	05.04.16
G21	4262	Czuba Roztocka	05.04.16
G22	4263	Czuba Roztocka	05.04.16
0	4264	Czuba Roztocka	05.04.16
G23	4265	Czuba Roztocka	05.04.16
0	4266	Czuba Roztocka	02.03.16

0	4267	Czuba Roztocka	02.03.16
0	4268	Czuba Roztocka	02.03.16
0	4269	Czuba Roztocka	02.03.16
0	4270	Pańszczyca	31.03.16
G24	4271	Pańszczyca	31.03.16
G25	4272	Pańszczyca	31.03.16
0	4273	Pańszczyca	31.03.16
G8	4274	Pańszczyca	31.03.16
0	4275	Pańszczyca	31.03.16
0	4276	Polanka pod uboczą	17.03.16
gat	4277	Polanka pod uboczą	17.03.16
gat	4278	Polanka pod uboczą	17.03.16
G13	4279	Polanka Pod Uboczem	17.03.16
G26	4280	Pyszna	27.02.16
0	4281	Kondratowy Wierch	06.04.16
G27	4282	Kontowy Wierch	06.04.16
0	4283	Kondratowy Wierch	06.04.16
G5	4284	Jaferowy	05.03.16
G5	4285	Jaferowy	05.03.16
0	4286	Jaferowy	05.03.16
0	4287	Jaferowy	05.03.16
G5	4288	Jaferowy	05.03.16
G5	4289	Jaferowy	05.03.16
G6	4290	Piec	31.03.16
G6	4291	Piec	31.03.16
G7	4292	Kulawiec	30.03.16
G6	4293	Kulawiec	30.03.16
0	4294	Kulawiec	30.03.16
G7	4295	Kulawiec	30.03.16
G6	4296	Kulawiec	30.03.16
G7	4297	Kulawiec	30.03.16
G6	4298	Kulawiec	30.03.16
G6	4299	Kulawiec	30.03.16
0	4300	Kulawiec	30.03.16
G6	4301	Kulawiec	30.03.16
G14	4302	Las Gąsienicowy	14.03.16
G14	4303	Las Gąsienicowy	14.03.16
G28	4304	Las Gąsienicowy	14.03.16
G29	4305	Las Gąsienicowy	14.03.16
0	4306	Kondratowy Wierch	14.03.16
G30	4307	Kondracki Wierch	14.03.16
G15	4308	Kondracki Wierch	14.03.16
0	4309	Kondratowy Wierch	14.03.16
G1	4310	Bobrowiec	22.02.16
0	4311	Bobrowiec	19.05.16
G11	4312	Waksmundzka Polana	21.06.16
G3	4313	Bobrowiec Mnichy	13.02.16

0	4314	Żar	24.02.16
G31	4315	Żar	24.02.16
gat	4316	Kulawiec	12.02.16
gat	4317	Kulawiec	12.02.16
G32	4318	Kulawiec	12.02.16
G33	4319	Herbik	22.02.16
G18	4320	Pańszczyca	20.04.16
G34	4321	Pańszczyca	03.03.16
G8	4322	Pańszczyca	03.03.16
G17	4323	Pańszczyca	03.03.16
G17	4324	Pańszczyca	03.03.16
0	4325	Pańszczyca	03.03.16
G18	4326	Pańszczyca	03.03.16
0	4327	Pańszczyca	03.03.16
0	4328	Pańszczyca	03.03.16
0	4329	Pańszczyca	03.03.16
0	4330	Pańszczyca	03.03.16
0	4331	Pańszczyca	03.03.16
0	4332	Pańszczyca	03.03.16
G9	4333	Pańszczyca	03.03.16
G9	4334	Pańszczyca	03.03.16
G16	4335	Pańszczyca	03.03.16
G10	4336	Jaferowy Grzbiet	13.04.16
G10	4337	Jaferowy Grzbiet	13.04.16
G10	4338	Jaferowy Grzbiet	13.04.16
0	4339	Jaferowy Grzbiet	13.04.16
gat	4340	Jaferowy Grzbiet	13.04.16
G35	4341	Rzepisko (Słowacja?)	01.05.16
0	4342	Piec	07.04.16
G6	4343	Piec	07.04.16
G6	4344	Piec	07.04.16
G6	4345	Piec	07.04.16
G36	4346	Piec	07.04.16
G6	4347	Piec	07.04.16
G6	4348	Piec	07.04.16
gat	4349	Bobrowiec S. żleb	10.03.16
0	4350	Bobrowiec S. żleb	10.03.16
0	4351	Bobrowiec S. żleb	10.03.16
0	4352	Kondracki Wierch	04.03.16
0	4353	Kondracki Wierch	04.03.16
G15	4354	Kondracki Wierch	04.03.16
0	4355	Kopa Smreczyńska	03.03.16
G6	4356	Piec	03.03.16
G6	4357	Piec	03.03.16
G6	4358	Piec	03.03.16
G37	4359	Piec	03.03.16
G6	4360	Piec	11.03.16

G6	4361	Piec	11.03.16
G6	4362	Piec	11.03.16
gat	4363	–	–
0	4364	Kulawiec	11.03.16
G7	4365	Kulawiec	11.03.16
0	4366	Pańszczyca	10.03.16
G38	4367	Pańszczyca	10.03.16
0	4368	Pańszczyca	10.03.16
0	4369	Pańszczyca	10.03.16
G11	4370	Pańszczyca	10.03.16
G11	4371	Pańszczyca	10.03.16
G16	4372	Pańszczyca	10.03.16
0	4373	Pańszczyca	10.03.16
0	4374	Sucha woda	10.03.16
0	4375	Sucha woda	10.03.16
0	4376	Sucha woda	10.03.16
0	4377	Sucha woda	10.03.16
0	4378	Sucha woda	10.03.16
gat	4379	Sucha woda	10.03.16
0	4380	Kulawiec	03.03.16
0	4381	Kulawiec	03.03.16
G7	4382	Kulawiec	03.03.16
G7	4383	Kulawiec	03.03.16
0	4384	Kulawiec	03.03.16
0	4385	Kulawiec	03.03.16

Tabela 2. Rozmieszczenie genotypów na terenie badań i wykaz prób, w których stwierdzono poszczególne genotypy

Symbol genotypu	Numer próby	Miejsce zbioru	Data
G1	4241	Bobrowiec	31.03.16
G1	4242	Bobrowiec	31.03.16
G1	4243	Bobrowiec	31.03.16
G1	4244	Bobrowiec	31.03.16
G1	4310	Bobrowiec	22.02.16
G2	4245	Bobrowiec	31.03.16
G2	4246	Bobrowiec	31.03.16
G2	4249	Bobrowiec	–
G3	4236	Bobrowiec Mnichy	17.03.16
G3	4237	Bobrowiec Mnichy	17.03.16
G3	4313	Bobrowiec Mnichy	13.02.16
G3	4251	Bobrowiec ch. regiel	31.03.16
G3	4252	Bobrowiec ch. regiel	31.03.16
G4	4255	Bobrowiec W. K	31.03.16
G4	4256	Bobrowiec W. K	31.03.16
G5	4284	Jaferowy	05.03.16
G5	4285	Jaferowy	05.03.16
G5	4288	Jaferowy	05.03.16
G5	4289	Jaferowy	05.03.16
G6	4290	Piec	31.03.16
G6	4291	Piec	31.03.16
G6	4293	Kulawiec	30.03.16
G6	4296	Kulawiec	30.03.16
G6	4298	Kulawiec	30.03.16
G6	4299	Kulawiec	30.03.16
G6	4301	Kulawiec	30.03.16
G6	4343	Piec	07.04.16
G6	4344	Piec	07.04.16
G6	4345	Piec	07.04.16
G6	4347	Piec	07.04.16
G6	4348	Piec	07.04.16
G6	4356	Piec	03.03.16
G6	4357	Piec	03.03.16
G6	4358	Piec	03.03.16
G6	4360	Piec	11.03.16
G6	4361	Piec	11.03.16
G6	4362	Piec	11.03.16

G7	4292	Kulawiec	30.03.16
G7	4295	Kulawiec	30.03.16
G7	4297	Kulawiec	30.03.16
G7	4365	Kulawiec	11.03.16
G7	4382	Kulawiec	03.03.16
G7	4383	Kulawiec	03.03.16
G8	4274	Pańszczyca	31.03.16
G8	4322	Pańszczyca	03.03.16
G9	4333	Pańszczyca	03.03.16
G9	4334	Pańszczyca	03.03.16
G10	4336	Jaferowy Grzbiet	13.04.16
G10	4337	Jaferowy Grzbiet	13.04.16
G10	4338	Jaferowy Grzbiet	13.04.16
G11	4312	Waksmundzka Polana	21.06.16
G11	4370	Pańszczyca	10.03.16
G11	4371	Pańszczyca	10.03.16
G12	4235	Bobrowiec Hurbaś	02.03.16
G12	4248	Bobrowiec	31.03.16
G13	4260	Czuba Roztocka	05.04.16
G13	4279	Polanka pod Uboczem	17.03.16
G14	4302	Las Gąsienicowy	14.03.16
G14	4303	Las Gąsienicowy	14.03.16
G15	4308	Kondracki Wierch	14.03.16
G15	4354	Kondracki Wierch	04.03.16
G16	4335	Pańszczyca	03.03.16
G16	4372	Pańszczyca	10.03.16
G17	4323	Pańszczyca	03.03.16
G17	4324	Pańszczyca	03.03.16
G18	4320	Pańszczyca	20.04.16
G18	4326	Pańszczyca	03.03.16
G19	4250	Bobrowiec J. żleb	31.03.16
G20	4261	Czuba Roztocka	05.04.16
G21	4262	Czuba Roztocka	05.04.16
G22	4263	Czuba Roztocka	05.04.16
G23	4265	Czuba Roztocka	05.04.16

G24	4271	Pańszczyca	31.03.16
G25	4272	Pańszczyca	31.03.16
G26	4280	Pyszna	27.02.16
G27	4282	Kontowy Wierch	06.04.16
G28	4304	Las Gąsienicowy	14.03.16
G29	4305	Las Gąsienicowy	14.03.16
G30	4307	Kondracki Wierch	14.03.16
G31	4315	Żar	24.02.16
G32	4318	Kulawiec	12.02.16
G33	4319	Herbik	22.02.16
G34	4321	Pańszczyca	03.03.16
G35	4341	Rzepisko SK	01.05.16
G36	4346	Piec	07.04.16
G37	4359	Piec	03.03.16
G38	4367	Pańszczyca	10.03.16

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

	BG16		TTT1		TUT2		BG12		TUT1		TUD4		TUT4		TUT3		BG18	
G1	156	168	208	208	172	172	158	158	211	211	132	160	166	178	154	154	190	190
G2	172	176	208	208	164	168	146	146	207	215	132	168	174	174	158	166	190	190
G3	168	172	208	208	156	168	170	170	215	215	160	168	178	178	154	154	190	190
G4	168	176	208	208	156	172	158	170	211	211	132	168	166	178	150	154	194	206
G5	168	176	204	208	156	176	146	170	215	215	132	160	170	182	154	154	190	194
G6	168	172	208	216	156	156	146	170	215	215	132	132	170	186	150	154	190	194
G7	168	176	204	208	156	164	146	170	215	215	132	168	170	182	154	154	190	194
G8	168	168	204	208	172	176	146	158	215	215	132	168	170	170	154	154	190	202
G9	168	180	208	208	156	156	146	158	211	215	132	132	174	178	154	154	190	190
G10	168	172	208	208	156	156	146	146	207	215	132	164	174	174	150	154	186	190
G11	168	168	208	208	156	172	146	170	215	215	164	168	166	170	150	154	190	190
G12	172	176	204	208	156	172	146	158	211	211	132	168	178	186	154	154	190	198
G13	168	176	208	208	164	172	158	182	215	215	132	168	170	186	154	154	190	194
G14	172	176	204	216	156	156	146	170	215	215	132	160	182	186	154	154	190	194
G15	172	172	208	208	156	164	146	186	211	211	132	168	174	178	154	154	190	194
G16	172	176	208	216	164	164	146	146	211	211	168	168	174	178	154	166	194	198
G17	168	172	208	208	156	156	146	186	211	211	168	168	174	186	150	154	190	194
G18	172	172	208	208	156	164	146	146	211	211	168	168	174	178	154	154	190	198
G19	176	176	208	208	156	172	158	174	211	211	132	168	166	178	154	154	194	206
G20	168	168	208	224	164	164	146	186	215	215	132	168	178	186	154	154	190	194
G21	168	176	208	208	156	164	0	0	215	215	132	168	170	178	154	162	190	198
G22	0	0	204	208	156	156	0	0	211	215	132	160	174	174	154	154	190	194
G23	0	0	208	208	156	156	146	186	211	211	132	132	178	178	154	154	190	194
G24	172	172	208	208	156	156	146	146	211	211	132	132	174	178	154	154	190	190
G25	172	176	208	208	156	156	146	146	207	207	164	168	170	178	154	162	194	206
G26	172	176	208	208	156	156	146	186	215	215	132	132	170	174	154	154	190	194
G27	168	168	208	228	156	172	146	146	215	215	132	164	170	178	154	162	186	198

G28	172	172	208	208	156	156	146	146	211	211	132	168	178	178	154	154	190	194
G29	172	176	208	224	156	164	146	146	215	215	168	168	170	174	154	154	190	194
G30	168	176	208	228	156	172	146	150	215	215	132	168	0	0	154	162	186	190
G31	168	172	208	216	164	164	170	170	211	211	132	132	170	182	162	162	194	194
G32	0	0	208	224	156	164	150	150	211	211	164	168	166	178	154	162	186	198
G33	168	168	208	228	156	164	146	186	215	215	168	168	178	186	154	154	186	206
G34	172	172	208	208	156	172	158	158	211	211	168	168	170	178	154	154	190	190
G35	172	176	208	208	156	168	146	146	207	211	132	132	166	186	154	154	194	194
G36	168	172	208	216	156	164	146	146	215	219	132	160	170	174	154	162	190	194
G37	168	172	216	216	156	156	170	170	215	215	132	132	170	170	150	154	190	194
G38	168	172	216	216	0	0	146	186	211	215	168	168	166	174	0	0	190	190

Tabela 4. Charakterystyka ogólnego poziomu zmienności genetycznej w populacji głuszca 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	35	5	3.04	0.686	0.671		-0.007
TTT1	38	5	1.83	0.421	0.453		0.084
TUT2	37	5	2.54	0.568	0.607		0.078
BG12	36	7	2.97	0.528	0.663	*	0.217
TUT1	38	4	2.32	0.184	0.568	*	0.683*
TuD4	38	4	2.64	0.605	0.622		0.040
TUT4	37	6	4.73	0.784	0.789		0.020
TUT3	37	5	1.63	0.378	0.388		0.037
BG18	38	6	2.92	0.737	0.658		-0.107
Średnia		5.22	2.74	0.543	0.602	*	0.111*

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 allelic 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.edu.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 reimplement 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., 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
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, 05.12.2016