

GENETYKA KONSERWATORSKA, CZYLI OCHRONA PRZYRODY W PRÓBÓWCE, CZ. II: GENETYKA JAKO NARZĘDZIE W OCHRONIE PRZYRODY

MACIEJ KONOPIŃSKI
ALEKSANDRA BIEDRZYCKA



Znajomość biologii gatunku oraz procesów zachodzących w populacjach jest kluczowa w planowaniu skutecznej ochrony gatunków i ekosystemów. Nawet jeśli przyczyny spadku liczebności populacji są tak oczywiste jak nadmierna eksploatacja czy utrata odpowiednich siedlisk, o sukcesie lub porażce ochrony mogą zdecydować inne czynniki, niezwiązane bezpośrednio z demografią. Pod koniec XX wieku do arsenału narzędzi ekologa dołączyła genetyka molekularna. Dzięki metodom genetycznym udało się poznać wiele elementów biologii gatunku, dla których uprzednio stosowane narzędzia były bezużyteczne. Genetyka otworzyła również możliwość wykorzystania nieinwazyjnie zbiera-

nych próbek, co ma ogromne znaczenie w przypadku gatunków chronionych, gdyż nie wymaga chwytania lub nawet zbliżania się do zwierząt, których populacje są często niezwykle małe. Odławianie osobników w celu wykonania badań lub oznakowania powoduje stres, a w niektórych sytuacjach może nawet doprowadzić do ich śmierci. Istnieje też wiele gatunków, które prowadzą skryty tryb życia, co utrudnia lub wręcz uniemożliwia ich obserwację. W ich przypadku narzędzia genetyczne bywają jedynym instrumentem dającym szansę poznania wielu aspektów ich biologii.

1 | Obraz DNA (pobrane z Pixabay)
fot. Gerd Altman

Jak policzyć zwierzęta, których nie chcemy łąpać?

Chyba najistotniejszym parametrem wykorzystywanym w ochronie przyrody jest liczebność populacji. W przypadku roślin policzenie osobników nie powinno nastęrczać trudności wykwalifikowanemu badaczowi, chyba, że mamy do czynienia z gatunkiem występującym w trudno dostępnym terenie. Inaczej wygląda sytuacja w przypadku zwierząt, które mogą się przemieszczać lub ukrywać przed obserwatorem. Istnieje wiele tradycyjnych metod oceny liczebności. Zwierzęta duże, żyjące na otwartych terenach można policzyć na podstawie obserwacji, z powierzchni ziemi, a także z drona czy helikoptera. Takie badania wykonuje się do od dziesiątek lat, na przykład w celu szacowania liczebności reniferów w Arktyce (Øritsland 1998), słoni na sawannach (Blanc i in. 2007) czy kozic w Tatrzańskim Parku Narodowym (Chovancova i in. 2006). Niektóre zwierzęta, jak rysie, kumaki czy długopłetwce posiadają na ciele wzory, które ułatwiają rozpoznanie osobników. Na podstawie zdjęć wykonywanych przez **fotopułapki** ocenia się liczebność rysy (Fleżar i in. 2019), a fotografie wzorów na płetwach ogonowych humbaków pozwoliły oszacować liczbę tych zwierząt w oceanach (Darling i Morowitz 1986). Przybliżoną ocenę liczebności można uzyskać na podstawie **śladów bytowania zwierząt**, na przykład tropów, odchodów, wypluwek, liczby nor. Są to jednak metody obarczone dużym błędem. Liczba znalezionych tropów zależy od rzeźby terenu, grubości pokrywy śniegowej, aktywności zwierząt, a także spo-

strzegawczości obserwatora. Porównując zagęszczenia populacji zamieszkującej określony teren można uzyskać różne wyniki nawet przy niezmiennym liczbie osobników. Alternatywą dla tradycyjnych metod są te oparte o **identyfikację genetyczną osobników z pozostawionych przez nie śladów**, takich jak odchody, włosy, wylinki czy wypluwki. W badaniach wykorzystuje się metody zaczerpnięte z kryminalistyki. Z zebranej próbki izolowane jest DNA osobnika i, tak jak w przypadku sprawców przestępstw, tworzony jest unikalny profil genetyczny. Na podstawie takich profili można zidentyfikować poszczególne osobniki, a następnie wykorzystując metody statystyczne oszacować rzeczywistą wielkość populacji zamieszkującej dany obszar. Metody genetyczne są od lat z powodzeniem wykorzystywane do monitorowania liczebności dużych drapieżników, takich jak wilki, rysie czy niedźwiedzie (np. Konopiński i in. 2018). Ogromną zaletą tych metod jest to, że, inaczej niż w przypadku tropień, obliczenia są wykonywane na podstawie prawdziwych osobników, które zostawiły swój ślad w środowisku.

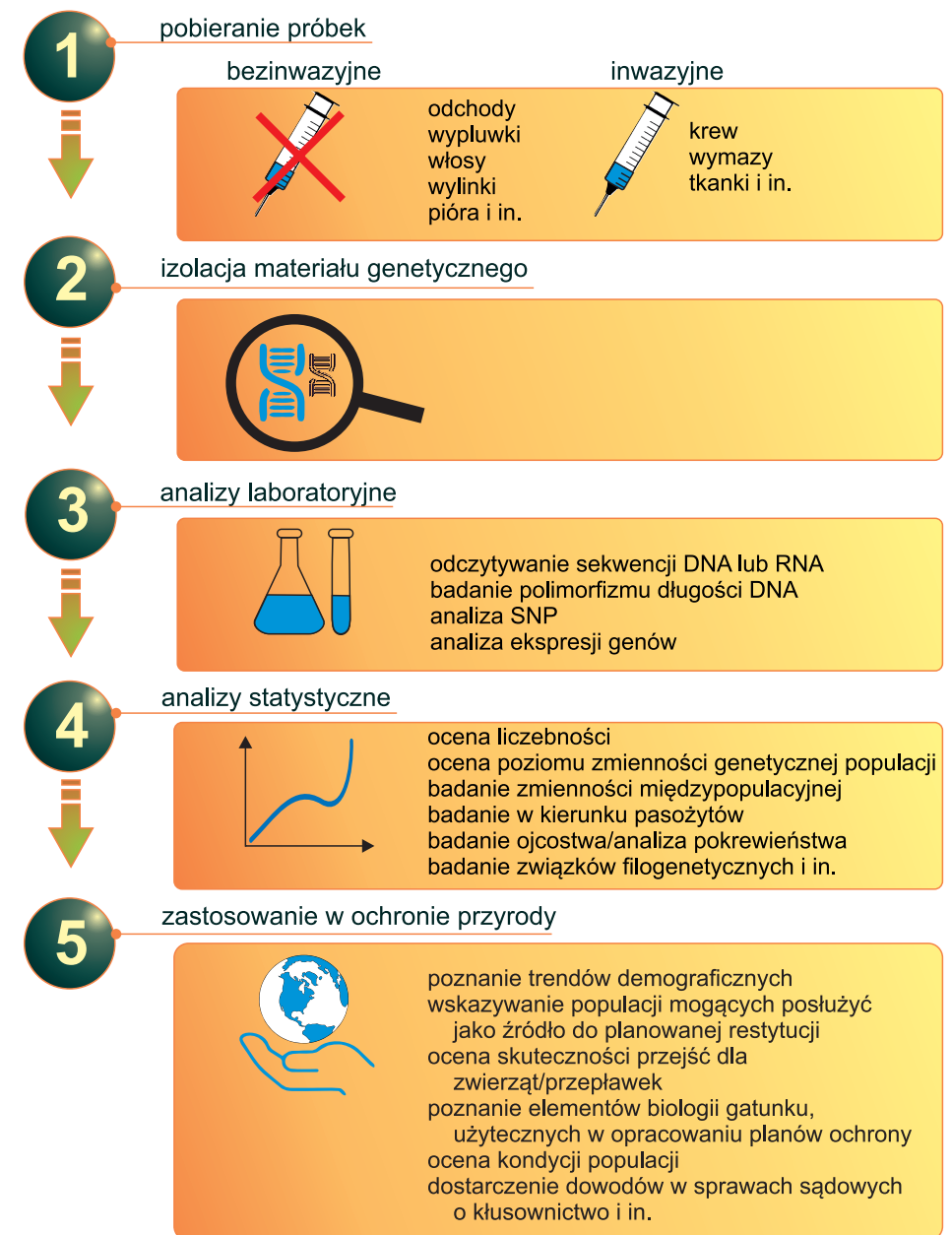
Liczenie zwierząt w zacciszu laboratorium

Aby policzyć osobniki, trzeba zebrać i zabezpieczyć próbki, wyizolować z nich DNA, a następnie oznaczyć genotyp osobnika, do którego należy próbka. Markerami genetycznymi, które najpowszechniej stosuje się w ocenach liczebności, są **loci mikrosatelitarne**. Są to wysoko zmienne fragmenty genomu, na podstawie których łatwo rozróżnić osobniki. Liczba badanych

loci musi być wystarczająco duża, żeby zminimalizować ryzyko powtórzenia się tego samego genotypu w różnych próbkach. Ponieważ nawet przy bardzo dużym nakładzie pracy jest bardzo mała szansa znalezienia próbek od każdego osobnika z danej populacji, to na koniec należy wykonać obliczenia statystyczne, które pozwolą stwierdzić, jaka jest całkowita liczebność populacji, włączając w to osobniki, których genotypy nie znalazły się wśród zebranych próbek.

Najczęściej wykorzystywanymi próbkami w ocenie liczebności populacji są odchody i włosy. Materiał genetyczny można również znaleźć w moczu pozostawionym na śniegu, śladach cieczi w czasie poprzedzającym okres godowy, czy w piórach zrzuconych przez ptaki. Uzyskanie dobrej jakości DNA z odchodów wcale nie jest łatwe. W odchodach znajduje się mnóstwo bakterii, które rozkładają materiał genetyczny. Z tego względu w naszej strefie klimatycznej najlepszą porą roku na zbiór próbek jest zima. Po pierwsze, temperatury w tym czasie są niskie, przez co aktywność bakterii i produkowanych przez nie enzymów znacznie spada, a po drugie – na śniegu można szukać tropów, które doprowadzą do miejsc defekacji. Niestety, niektóre zwierzęta nie są aktywne w zimie. Jeśli chcielibyśmy policzyć tą metodą niedźwiedzie, moglibyśmy nie znaleźć wystarczającej liczby próbek. Dlatego do szacowania liczebności niedźwiedzi znacznie lepiej sprawdzą się pułapki włosowe, a odchody mogą być uzupełniającym źródłem materiału genetycznego. Jeśli chcemy oprzeć nasze oszacowania na próbkach

włosów, należy je zbierać w sposób systematyczny, rozmieszczając pułapki na włosy w terenie, a dodatkowo, żeby mieć pewność, że wszystkie włosy w pułapce pochodzą od jednego osobnika, najlepiej umieścić w jej pobliżu fotopułapkę, która zarejestruje zwierzęta odwiedzające dane miejsce. Aby przyciągnąć zwierzęta, stosuje się różnego rodzaju „wabiki”. Żbiki, jak to koty, uwielbiają kocimiętkę, dlatego, aby zwiększyć skuteczność pułapki, wystarczy ją nasączyć wyciągiem z kocimiętki właściwej *Nepeta cataria*. W ich przypadku za pułapkę może posłużyć nieoheblowany, drewniany kołek wystający z ziemi – żbiki z lubością ocierają się o taki kołek zostawiając przy tym kłaczki sierści. Niedźwiedzie lubią smołę bukową, dlatego pułapkę w postaci zwykłego drutu kolczastego owiniętego wokół drzewa smaruje się taką właśnie mazią. Pojedynczy włos rzadko wystarcza do stworzenia kompletnego profilu, dlatego należy użyć wszystkich włosów znalezionych w pułapce. To jednak może spowodować, że w próbce znajdzie się materiał genetyczny od więcej niż jednego osobnika. Na szczęście takie próbki dosyć łatwo jest wykryć. Z założenia znamy ploidalność badanego gatunku (liczbę zestawów chromosomów znajdujących się w jądrze komórkowym), wiemy zatem, jakiej liczby różnych alleli możemy się spodziewać. W przypadku ssaków, które zawsze są diploidalne (posiadają dwa zestawy chromosomów – jeden od ojca, drugi od matki), będą to jeden lub dwa allele w pojedynczym locus. Wykrycie większej liczby alleli wskazuje na obecność w próbce DNA pochodzącego od więcej niż jednego osobnika.



Oczywiście nie wszystkie gatunki można policzyć stosując narzędzia genetyczne. Żeby oszacowanie było bliskie rzeczywistej liczebności należy zebrać od dwóch do trzech razy więcej próbek, niż spodziewamy się zwierząt zamieszkujących dany obszar. Dla przykładu, jeśli chcielibyśmy policzyć sarny czy dziki zamieszkujące samą tylko Puszcę Białowieską, oznaczałoby to konieczność przeanalizowania wielu tysięcy próbek, co wymagałoby ogromnego nakładu pracy w laboratorium oraz wiązałoby się z gigantycznymi kosztami. Znacznie lepiej w takim przypadku sprawdzą się metody tradycyjne jak pędzenia albo nowoczesne metody oparte o tak zwaną teledetekcję.

Efektywna wielkość populacji

W poprzedniej części (Konopiński 2021) opisane zostały skutki utraty zmienności genetycznej przez gatunki zagrożone. Nasilenie procesu losowej utraty zmienności (dryfu genetycznego) jest związane z wielkością populacji – im mniejsza populacja, tym utrata zmienności następuje szybciej. Jednak sama znajomość liczebności populacji nie wystarczy, aby ocenić, czy jej wielkość jest wystarczająca, by nie doszło do utraty zmienności. Jedyłą miarą, która pozwala na taką ocenę, jest tak zwana efektywna wielkość populacji. Zależy ona od liczby osobników biorących udział w rozmnażaniu i pozostawiających po sobie potomstwo, a także, u zwierząt rozmnażających się płciowo, od proporcji płci. U niektórych gatunków w rozmnażaniu bierze udział mała część osobników, co może doprowadzić do sytuacji, w której nawet z pozoru duża populacja wciąż będzie

traciła zmienność. Dla przykładu samce jeleni czy słoni morskich walczą ze sobą o haremy samic, a do rozmnażania przystępują tylko najsilniejsze samce. W grupie rodzinnej wilków „monopol” na rozmnażanie ma tak zwana para alfa. Młode wilki, żeby się rozmnożyć, muszą opuścić grupę i założyć własną watahę zajmując inne terytorium lub wstrzymać się z rozrodem pozostając w cieniu samca lub samicy alfa. Dlatego w ustabilizowanej populacji wilka efektywna wielkość populacji jest znacznie mniejsza od całkowitej liczby osobników. U innych gatunków ograniczeniem bywa liczba miejsc nadających się do założenia gniazda (Jiménez-Franco i in. 2018). Zdarza się również, że różnice w sukcesie rozrodczym pomiędzy osobnikami są tak duże, że potomstwo kilku par zdominuje przyszłe pokolenia. Jest to szczególnie niebezpieczne w programach hodowli *ex situ*. Po odłowieniu osobników w celu założenia hodowli może się okazać, że nie wszystkie osobniki równie dobrze radzą sobie z rozmnażaniem w niewoli i część osobników nie weźmie udziału w rozrodzie. **Efektywną wielkość populacji można ocenić na podstawie analiz genetycznych.** Najbardziej bezpośrednią metodą są badania ojcostwa w miocie lub lęgu. Używając metod genetycznych podobnych do oznaczania ojcostwa u ludzi można sprawdzić, czy cały miot pochodzi od jednego samca, czy też samice kopulowały z innymi samcami. Tutaj również przydają się loci mikrosatelitarne. Wykrycie u potomstwa alleli różnych od tych, które mogły zostać odziedziczone od matki i potencjalnego ojca, wskazuje, że ojcem w rzeczywistości był inny osobnik. Kojarzenia pozapartnerskie są trudne do

2 | W monitorowaniu liczebności wilków od lat z powodzeniem wykorzystuje się metody genetyczne
fot. Cezary Korkosz



wykrycia za pomocą zwykłych obserwacji, ponieważ dominujące samce pilnują samic należących do haremu lub zamieszkujących wywalczony przez nich teren. Samice muszą zatem uciekać się do podstępów, aby zostać zapłodnione przez inne samce i tym samym zwiększyć różnorodność genetyczną własnego potomstwa.

Efektywną wielkość populacji można również obliczyć na podstawie poziomu różnorodności genetycznej oraz tempa

mutacji albo obserwując zmiany poziomu zmienności w kolejnych pokoleniach.

Migracje osobników

W utrzymaniu zmienności genetycznej pomaga napływ osobników z innych populacji. Z tego względu niezwykle ważne jest utrzymanie łączności pomiędzy populacjami – tak zwanych korytarzy ekologicznych, czyli skomunikowanych ze sobą obszarów środowiska o cechach optymalnych dla

danego gatunku. Przemieszczanie się zwierząt można badać stosując znakowanie lub nadajniki radiowe na przykład wyposażone w odbiornik GPS. Takie metody śledzenia ruchów zwierząt dostarczają ogromnej ilości danych na temat przemieszczania się, aktywności dobowej czy preferencji siedliskowych. Nie dają one jednak odpowiedzi na pytanie, czy przemieszczające się osobniki biorą następnie udział w rozrodzie wzbogacając genetycznie populację, do której przybyły. Porównując **zmiennosc genetyczną** możemy określić, czy dany osobnik jest migrantem z innej populacji, wykryć populację, z której pochodzi, lub określić ogólne natężenie migracji pomiędzy poszczególnymi regionami. Na podstawie tych wyników można na przykład sprawdzić, czy przepławki dla ryb skonstruowane przy tamach i progach na rzekach są używane przez ryby albo czy zwierzęta korzystają z korytarzy ekologicznych. Dane na temat łączności pomiędzy różnymi fragmentami zasięgu gatunku pozwalają określić, jak duży obszar jest zamieszkiwany przez pojedynczą populację, co może być przydatne w tworzeniu obszarów ochronnych oraz w planowaniu ochrony gatunkowej.

Kondycja genetyczna populacji

Genetyka może być wykorzystywana do badania kondycji populacji. Badanie poziomu zmienności jest podstawowym elementem genetyki konserwatorskiej. Określa się w ten sposób tak zwaną kondycję genetyczną populacji. Szerzej na ten temat można przeczytać w części pierwszej (Konopiński 2021). W trakcie procesu restytucji gatunku

jest niezwykle ważne, aby nie dopuścić do utraty zmienności w nowo powstałej populacji. Początkowo kondycję populacji, które przeszły przez wąskie gardło demograficzne (zwykle doświadczając redukcji zmienności genetycznej), określano nie za pomocą markerów kodujących białka, ale za pomocą markerów neutralnych, a więc takich, które nie podlegają działaniu doboru naturalnego (np. introny czy loci mikrosatelitarne).

Z czasem zaczęły się pojawiać dowody, że utrata zmienności w regionach niekodyujących niekoniecznie odzwierciedla stan zmienności w ważnych regionach genomu. Oznacza to, że ogólna **utrata zmienności nie musi się wiązać z niekorzystnym wpływem na kondycję genetyczną populacji**. Świetnym przykładem jest historia lisów z wyspy San Nicolas w pobliżu południowej Kalifornii (Aguilar i in. 2004). Populacja tych ssaków została prawie całkowicie wytępiona – ocalało jedynie kilka osobników. Spadek liczebności wywołał ekstremalny spadek neutralnej zmienności genetycznej. Jednocześnie badania pięciu genów głównego kompleksu zgodności tkankowej (**MHC**) wykazały wysoki poziom zmienności genetycznej. Geny MHC, dzięki swojej bardzo wysokiej zmienności utrzymywanej poprzez koewolucję z patogenami, które są jednym z najważniejszych czynników wpływających na dostosowanie dzikich populacji, okazały się być ważnymi markerami genetycznymi pozwalającymi ocenić kondycję populacji. Współcześnie badania genetyczne zagrożonych gatunków coraz częściej wykorzystują arsenał najnowocześniejszych technik badania genomu. W ostatnich latach błyskawiczny rozwój metod sekwen-

cjonowania wielkoskalowego pozwolił na prowadzenie badań, które jeszcze niedawno trudno było sobie wyobrazić. Dzięki masowemu sekwencjonowaniu genomów udało się między innymi opracować szczepionkę na zaraźliwy nowotwór zagrażający diabłom tasmańskim (Owen i Siddle 2019).

Taksonomia molekularna

Metody genetyczne wykorzystuje się nie tylko w badaniach na poziomie populacji, ale również na poziomie gatunków czy wyższych taksonów. Istnieje gałąź wiedzy zwana taksonomią molekularną, która **wykorzystuje sekwencje DNA do badania ewolucji gatunków**. Jeszcze pół wieku temu jedynym narzędziem ewolucjonisty było badanie cech morfologicznych. Istnieją jednak gatunki, których zmienność morfologiczna jest na tyle mała, że nie da się na jej podstawie jednoznacznie stwierdzić, czy dana grupa organizmów stanowi odrębny gatunek. Przykładem mogą być spory wokół liczby gatunków słonia afrykańskiego. Jeszcze kilka dekad temu uczono nas w szkołach, że obecnie na świecie występują dwa gatunki słonia: afrykański i indyjski. Naukowcy, co prawda, od lat toczyli debatę na temat podziałów taksonomicznych słonia afrykańskiego, ale nie mogli dojść do porozumienia, czy poszczególne populacje stanowią ekotypy, podgatunki czy gatunki. Dopiero zastosowanie badań genetycznych pozwoliło bezsprzecznie potwierdzić, że słoń afrykański to w istocie dwa gatunki – słoń afrykański *Loxodonta africana* oraz wyodrębniony z tego gatunku słoń leśny *Loxodonta cyclotis* (Roca i in. 2001). Odkrycie to miało bezpośrednie

przełożenie na strategię ochrony gatunkowej, ponieważ słoń leśny został objęty ochroną jako odrębny gatunek. W taksonomii molekularnej stosuje się często tak zwane **barkody** (niezbyt zgrabny termin zaczerpnięty z angielskiego *barcode*, czyli kod paskowy). Są to sekwencje określonych regionów genomu, które pozwalają na przyporządkowanie do gatunku, rodzaju lub wyższego taksonu. Rozwój sekwencjonowania wielkoskalowego przyczynił się do powstania metod, które przy użyciu barkodów pozwalają na badanie bioróżnorodności całych ekosystemów. Co ciekawe, badania bioróżnorodności można prowadzić nie mając nawet dostępu do poszukiwanych w środowisku organizmów. Ponieważ sekwencjonowanie wielkoskalowe pozwala na jednoczesne odczytanie bardzo wielu sekwencji w jednej próbce, można za jego pomocą analizować DNA wyizolowane z próbek wody, gleby czy nawet z powietrza. W próbkach wody można znaleźć DNA mikroskopijnych glonów, bakterii, sinic, ale także dużych organizmów – ryb, mięczaków czy skorupiaków. Drobinę odfiltrowane z powietrza to między innymi pyłki roślin. Metoda ta została nazwana **metabarkodingiem** i polega na wykrywaniu gatunków na podstawie podobieństwa uzyskanych sekwencji z tymi zgromadzonymi w ogólnodostępnych bazach danych sekwencji, takich jak amerykański GenBank, europejski European Nucleotide Archive lub japoński DNA Data Bank of Japan. Dzięki niej możemy oszacować bioróżnorodność danego regionu i wykrywać organizmy, których stwierdzenie za pomocą klasycznych metod byłoby bardzo trudne lub wręcz niemożliwe.

Analizę DNA środowiskowego można użyć do wykrywania rzadkich gatunków lub trapiących je chorób (np. dżuma raczej, która dziesiątkuje nasze populacje raka szlachetnego). Innym zastosowaniem metabarkodingu może być na przykład oszacowanie różnorodności patogenów w próbkach odchodów czy określanie mikrobiomu, czyli składu bakteryjnego skóry czy różnych odcinków przewodu pokarmowego. Wbrew pozorom takie badania mogą odegrać znaczącą rolę również w ochronie przyrody. Znajomość presji ze strony patogenów pozwala wyciągnąć wnioski na temat kondycji populacji, a bogactwo i skład mikrobiomu może wskazywać choćby na współwystępowanie rozmaitych chorób. Metabarkodowanie można stosować również do określania diety populacji czy gatunków (Kowalczyk i in. 2019). DNA wyizolowane z odchodów i poddane sekwencjonowaniu wielkoskalowemu przy użyciu barkodów charakterystycznych dla odpowiednich grup roślin, bezkręgowców czy kręgowców pozwala określić gatunki, które wchodzi w skład diety interesującego nas organizmu. Badania diety mogą z kolei pomóc zrozumieć, w jaki sposób zwierzęta przyczyniają się do rozsiewania niektórych gatunków roślin (García-Rodríguez i in. 2021).

W zmieniających się warunkach klimatycznych i biorąc pod uwagę zwiększającą się antropopresję, obok ratowania gatunków zagrożonych, coraz większego znaczenia nabiera konieczność ochrony tzw. odpornych (ang. *resilient*) ekosystemów i populacji. Taki rodzaj odporności wynika przede wszystkim z zachowanych

możliwości adaptacyjnych populacji i gatunków tworzących dany ekosystem. Tutaj również przychodzi z pomocą genetyka. Wykorzystując badania genomowe możemy oszacować zmienność zarówno na poziomie całego genomu, jak i zmienność poszczególnych istotnych genów, które mogą mieć znaczenie dla przetrwania w zmieniających się warunkach środowiska. Być może już w niedalekiej przyszłości określenie ogólnych wzorców genetycznych, jakimi powinny się charakteryzować odporne ekosystemy i populacje, pozwoli na ocalenie jak największej części bioróżnorodności naszej planety.

Genetyka sądowa

Genetyka znajduje wreszcie zastosowanie przy egzekwowaniu prawa dotyczącego ochrony przyrody (Burnham-Curtis i in. 2021). Genetyka sądowa obejmuje bowiem nie tylko poszukiwanie sprawców przestępstw czy potwierdzanie ojcostwa, ale też dostarcza materiału dowodowego w sprawach dotyczących kłusownictwa, czy handlu gatunkami chronionymi. Do tego celu wykorzystuje się metody stosowane w taksonomii molekularnej. Materiał genetyczny wyizolowany z gulaszu albo leków stosowanych w tradycyjnej medycynie chińskiej może stanowić dowód w sprawie sądowej o pozyskiwanie i handel zagrożonymi gatunkami.

Maciej Konopiński

konopinski@iop.krakow.pl

Aleksandra Biedrzycka

Instytut Ochrony Przyrody Polskiej Akademii Nauk
al. Adama Mickiewicza 33, 31-120 Kraków

LITERATURA

Aguilar A., Roemer G., Debenham S., Binns M., Garcelon D., Wayne R. K. 2004. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (10): 3490–3494.
DOI: 10.1073/pnas.0306582101

Blanc J.J., Barnes R.F.W., Craig G.C., Dublin H.T., Thouless C.R., Douglas-Hamilton I., Hart J.A. 2007. African elephant status report 2007: an update from the African elephant database. IUCN.
DOI: 10.2305/IUCN.CH.2007.SSC-OP.33.en

Burnham-Curtis M.K., Straughan D.J., Hamlin B.C., Draheim H.M., Gray Partin T.K., Wostenberg D.J. 2021. *Wildlife Forensic Genetics and Biodiversity Conservation: The Intersection of Science, Species Management, and the Law*. W: Underkoffler S.C., Adams H.R. (red.). *Wildlife Biodiversity Conservation: Multidisciplinary and Forensic Approaches*. Springer International Publishing, Cham: 163–191.
DOI: 10.1007/978-3-030-64682-0_8

Chovancova B., Zięba F., Zwijacz-Kozica T. 2006. Polskie i słowackie liczenie kozic: założenia, metody, źródła błędów. W: Z. Krzan Z. (red.). *Tatrzański Park Narodowy na tle innych górskich terenów chronionych*. TPN, Zakopane.

Darling J.D., Morowitz H. 1986. Census of „Hawaiian” humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) by individual identification. *Canadian Journal of Zoology* 64 (1): 105–111
DOI: 10.1139/z86-017

Fležar U., Pičulin A., Bartol M., Černe R., Stergar M., Krofel M., Potočnik H., Kljun F. 2019. Eurasian lynx (*Lynx lynx*) monitoring with camera traps in Slovenia in 2018–2019. <https://www.lifelynx.eu/wp-content/uploads/2019/09/Lynx-monitoring-SLO-2018-19.pdf>

García-Rodríguez A., Albrecht J., Szczutkowska S., Valido A., Farwig N., Selva N. 2021. The role of the brown bear *Ursus arctos* as a legitimate megafaunal seed disperser. *Scientific Reports* 11 (1): 1282.
DOI: 10.1038/s41598-020-80440-9

Jiménez-Franco M.V., Martínez-Fernández J., Martínez J.E., Pagán I., Calvo J.E., Esteve M.A. 2018. Nest sites as a key resource for population persistence: A case study modelling nest occupancy under forestry practices. *PLOS ONE* 13 (10), e0205404.
DOI: 10.1371/journal.pone.0205404

Konopiński M.K. 2021. Genetyka konserwatorska, czyli ochrona przyrody w próbowce. Cz. I: Ochrona zmienności wewnątrzgatunkowej. *Chrońmy Przyrodę Ojczyzną* 77 (2): 14–21.

Konopiński M., Berezowska-Cnota T., Selva N., Sergiel A., Zwijacz-Kozica T. 2018. Ocena liczebności niedźwiedzia brunatnego *Ursus arctos* na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego / Assessment of the brown bear *Ursus arctos* population size in Tatra National Park. *Chrońmy Przyrodę Ojczyzną* 74 (6): 410–421.

Kowalczyk R., Wójcik J.M., Taberlet P., Kamiński T., Miquel C., Valentini A., Craine J.M., Coissac E. 2019. Foraging plasticity allows a large herbivore to persist in a sheltering forest habitat: DNA metabarcoding diet analysis of the European bison. *Forest Ecology and Management* 449: 117474.
DOI: 10.1016/j.foreco.2019.117474

Øritsland N.A. 1998. Reindeer population size and trend on Edgeøya Svalbard. *Polar Research* 17 (1): 101–105.
DOI: 10.3402/polar.v17i1.6612

Owen R.S., Siddle H.V. 2019. Devil Facial Tumours: Towards a Vaccine. *Immunological Investigations* 48 (7): 719–736.
DOI: 10.1080/08820139.2019.1624770

Roca A.L., Georgiadis N., Pecon-Slattery J., O'Brien S.J. 2001. Genetic Evidence for Two Species of Elephant in Africa. *Science* 293 (5534): 473–477.
DOI: 10.1126/science.1059936