

Nazwa zadania:

Zebranie materiału genetycznego cietrzewia w krajowych ostojach w celu przyszłej reintrodukcji bądź zasilenia istniejącej populacji w Puszczy Knyszyńskiej.

I. Opis przedmiotu zamówienia

Celem realizacji przedmiotu zamówienia jest:

- analiza struktury genetycznej istniejących obecnie populacji cietrzewia, a w szczególności określenie wpływu drastycznego spadku liczebności na zmienność genetyczną poszczególnych populacji i zróżnicowania genetyczne pomiędzy badanymi populacjami,
- oszacowanie stopnia zagrożenia poszczególnych populacji zjawiskiem inbrodu,
- identyfikacja głównych populacji zasilających obecny system metapopulacji cietrzewia w Puszczy Knyszyńskiej,
- umiejscowienie krajowych populacji cietrzewia na drzewie ewolucyjnym populacji euroazjatyckiej, dzięki czemu możliwe będzie określenie genealogicznych zależności między populacjami krajowymi i populacjami z innych rejonów Eurazji,
- opracowanie, w oparciu o dane genetyczne, wytycznych do prowadzenia dalszej ochrony czynnej tego gatunku w ostoi 'knyszyńskiej' oraz wskazanie populacji krajowych i zagranicznych, z których ptaki będą mogły w przyszłości stanowić źródło reintrodukcji bądź zasilenia.

Zadanie to będzie realizowane w czterech etapach:

1) Zebranie materiału biologicznego (pióra, odchody, tkanki), jako źródła DNA. W trakcie realizacji badań planuje się pozyskanie min. 300 prób materiału biologicznego. Materiał powinien pochodzić z ostoi nizinnych, jak i górskich – zgodnie z załączoną poniżej tabelą. Jako pojedynczą próbę uznaje się zebranie materiału pochodzącego z jednego stanowiska w danym dniu lub od jednego osobnika w danym dniu. W przypadku zebrania materiału na tokowiskach należy określić liczbę ptaków stwierdzonych na tym stanowisku. W przypadku znanych tokowisk, na których tokuje 1 kogut ponowne zebranie materiału może zostać dokonane po 7 dniach. Jeśli jest to możliwe z każdego stanowiska próby należy pobierać dwukrotnie w ciągu sezonu lęgowego.

W przypadku prób nieinwazyjnych (pióra, odchody znajdujące w terenie) przeznaczonych do wyznaczania wskaźników, dotyczących obecnej dystrybucji zmienności genetycznej w analizowanych populacjach (głównie dane genotypowe), próby nie powinny starsze niż 21 dni (załącznik 1 do szczegółowego opisu przedmiotu zamówienia), chyba że zostały odpowiednio zakonserwowane zaraz po zbiorze (zamrożenie). W takim przypadku dopuszcza się wykorzystanie materiału nie starszego niż 15 lat. W przypadku określania genealogicznych zależności między populacjami krajowymi i populacjami z innych rejonów Eurazji oraz okresowych zmian w poziomie zmienności genetycznej i strukturze genetycznej populacji krajowych, powinny zostać podjęte próby wykorzystania każdego dostępnego materiału, w tym prób z okazów muzealnych.

Osoby pobierające materiał genetyczny w sposób inwazyjny powinny mieć stosowne pozwolenia wydane przez właściwą regionalną dyrekcję ochrony środowiska (zezwolenie na odstąpienie od zakazów w stosunku do gatunków dziko występujących) oraz, w przypadku stref ochronnych – dysponować stosownym zezwoleniem na wejście do stref ochronnych wydanym przez odpowiednie instytucje (regionalne dyrekcje ochrony środowiska, dyrekcje parków narodowych).

| L.p. | Miejsce pobranego materiału biologicznego | ilość prób |
|------|---|--|
| 1. | Ostoja Góry Izerskie | wymaga się zebrania łącznie min. 300 prób, z |
| 2. | Ostoja Karkonosze | |

| | | |
|----|---------------------------------------|--|
| 3. | Ostoja Orzysz | zastrzeżeniem, że w poszczególnych lokalizacjach wskazanych w poz. 1-8 minimalna ilość prób wynosić będzie 10 prób |
| 4. | Ostoja Torfowiska Orawsko-Nowotarskie | |
| 5. | Ostoja Puszcza Knyszyńska | |
| 6. | Ostoja Tatry | |
| 7. | Ostoja Torfowisko Karaska | |
| 8. | Ostoja Muszaki | |
| 9. | Pozostałe obszary | |
| | Łącznie | |

- 2) Izolacja DNA z zebranych prób i wykonanie analiz genetycznych, polegających na genotypowaniu mikrosatelitarnym i sekwencjonowaniu fragmentu DNA mitochondrialnego, wykorzystywanego w analizach na poziomie gatunku.
- 3) Wykonanie analiz statystycznych uzyskanych wyników, polegających na określeniu:
- różnorodności genetycznej krajowych populacji cietrzewia;
 - stopnia heterozygotyczności;
 - zróżnicowania genetycznego pomiędzy populacjami;
 - oszacowaniu inbredu w każdej populacji;
 - określeniu dystansu genetycznego pomiędzy nimi oraz określenie genealogicznych zależności między populacjami krajowymi i populacjami z innych rejonów Eurazji.

Analiza nastąpić ma w oparciu o dane pozyskane wskutek realizacji pkt 1 i 2 oraz w oparciu o informacje i dane powszechnie dostępne.

- 4) Przygotowanie raportu podsumowującego uzyskane wyniki, wraz z propozycjami koniecznych do realizacji działań ochronnych, a także sugestie dotyczące wyznaczenia populacji źródłowej dla populacji cietrzewia w Puszczy Knyszyńskiej w przypadku przyszłej reintrodukcji gatunku.

W szczególności raport powinien zawierać:

- a) podstawowe miary zmienności genetycznej w poszczególnych krajowych populacjach, oparte na wskaźnikach polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych;
- b) porównanie tych wskaźników z danymi literaturowymi, co pozwoli określić wpływ spadku liczebności na zmienność genetyczną poszczególnych populacji oraz stopnia zagrożenia poszczególnych populacji zjawiskiem inbredu,
- c) wyniki oszacowania dystansu genetycznego między poszczególnymi populacjami krajowymi, oparte na polimorfizmie markerów mikrosatelitarnych i frekwencji haplotypów DNA mitochondrialnego i ich porównanie z danymi literaturowymi, co pozwoli określić wpływ spadku liczebności na zróżnicowanie genetyczne pomiędzy badanymi populacjami oraz identyfikacja głównych populacji zasilających obecny system metapopulacji cietrzewia w Puszczy Knyszyńskiej;
- d) porównanie sekwencji DNA mitochondrialnego populacji krajowych z danymi literaturowymi, co pozwoli określić genealogiczne zależności między populacjami krajowymi i populacjami z innych rejonów Eurazji;
- e) opis metodyki izolacji DNA, opis warunków przeprowadzenia reakcji PCR, listę wykorzystanych markerów, listę haplotypów.

II. Termin wykonania prac

Termin zakończenia całości przedmiotu zamówienia: **do 10 września 2015 r., w tym:**

| Etapy pracy | Termin przedstawienia przez Wykonawcę materiałów do odbioru |
|--|---|
| Etap I Zebranie materiału biologicznego | do 15 czerwca 2015 r. |

| | |
|--|------------------------|
| Etap II Izolacja DNA z zebranych prób i wykonanie analiz genetycznych | do 31 sierpnia 2015 r. |
| Etap III Wykonanie analiz statystycznych uzyskanych wyników | |
| Etap IV Wykonanie raportu podsumowującego | do 10 września 2015 r. |

Załącznik 1 do szczegółowego opisu przedmiotu zamówienia

INSTRUKCJA POBIERANIA I PRZECHOWYWANIA PIÓR I TKANEK CIETRZEWIA

1. Pióra pozyskiwane pół-inwazyjnie: pióra (okrywowe, lotki i sterówki) najlepiej pobierać z kupra (pisklęta) lub z piersi (ptaki dorosłe). Od każdego osobnika powinno zostać pobranych od 3 do 5 piór. **Pióra należy przechowywać w papierowych kopertach w ciemnych, suchych i chłodnych miejscach. Nie powinny być wystawione na działanie promieni słonecznych. Materiał z każdego osobnika powinien być przechowywany w oddzielnej kopercie! Na kopertach należy napisać (drukowanymi literami) datę i charakterystykę osobnika, od którego zostały pobrane. Pióra można także umieszczać zaraz po pobraniu w probówkach z alkoholem (75%–96%, koniecznie cz.d.a!).**

2. **Pióra pozyskiwane nieinwazyjnie:** lotki i sterówki (które wypadły w wyniku pierzenia) znalezione w pobliżu gniazd, miejsc odpoczynku, noclegowisk i paprzysk, jak również pióra osobników zabitych przez drapieżniki. **Pióra należy przechowywać w papierowych kopertach w ciemnych, suchych i chłodnych miejscach. Nie powinny być wystawione na działanie promieni słonecznych. Każde pióro powinno znaleźć się z oddzielnej kopercie z dokładnym opisem (drukowanymi literami) miejsca zbioru (Nadleśnictwo, leśnictwo, oddział, ew. koordynaty GPS, wszystkie dodatkowe informacje, np. płeć osobnika, od którego pochodzi). Pióra można także umieszczać zaraz po pobraniu w probówkach z alkoholem (75%–96%, koniecznie cz.d.a!).**

3. Tkanki stałe należy pobierać sterylnym skalpelem. Do analiz wystarczy fragment tkanki o średnicy ok. 1 centymetra. Pobraną tkankę należy umieszczać zaraz po pobraniu w probówkach z alkoholem (75%–96%, koniecznie cz.d.a!). Każdy rodzaj tkanki stałej nadaje się do prowadzenia analiz molekularnych

4. Tkanki płynne (krew): krew (pojedyncza kropla) należy pobierać na Karty Whatman FTA. Krople krwi należy umieścić w centrum okręgu wyznaczonego na Karcie FTA, wysuszyć na powietrzu przez kilka (10-15) minut, a następnie umieścić w kopercie. Na Karcie (poza okręgiem do stabilizacji próby), jak i na kopercie należy napisać (drukowanymi literami) datę i charakterystykę osobnika, od którego zostały pobrane. Karty Whatman FTA powinny być przechowywane w ciemnym, chłodnym miejscu.

INSTRUKCJA POBIERANIA I PRZECHOWYWANIA ODCHODÓW CIETRZEWIA

1. Świeże odchody (1 – 21 dni) umieszczamy w pojemniku (do 5 knotów od jednego osobnika).
2. Zасыpujemy żelem krzemionkowym, w objętości odpowiadającej objętości knotów i zamykamy pojemnik.
3. **Żel absorbuje wilgoć i zmienia kolor z pomarańczowego na bezbarwny. W przypadku wyjątkowo wilgotnych knotów (gdy wszystkie granulki zmienia barwę) wskazane jest dosypanie drugiej porcji żelu.**
4. Przechowujemy w temperaturze pokojowej.

UWAGA: żel krzemionkowy przechowujemy w szczelnie zamkniętym pojemniku, żeby nie absorbował wilgoci z otoczenia.

Lub

5. Świeże odchody (1 – 21 dni) suszymy w temperaturze pokojowej (**nie na kaloryferze!!!**).
6. Mrozimy (w kopercie / pojemniku plastikowy / tekturowym / pudełku od zapalek).