

**Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Instytut Nauk o Zwierzętach

Mgr inż. Karol Puchała

**Kompleksowa analiza zmienności
genetycznej polskiej populacji sokoła
wędrownego (*Falco peregrinus*)**

Comprehensive analysis of genetic variation in the Polish peregrine
falcon population (*Falco peregrinus*)

Praca doktorska

Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem:

Prof. Dr hab. Wanda Olech-Piasecka

Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
INSTYTUT NAUK O ZWIERZĘTACH
02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8
tel. 22 59-36510

Warszawa, 2023

KIEROWNIK SEKRETARIATU
Instytutu Nauk o Zwierzętach

W. Piasecka

2023 - 10 - 06

[Signature]
/ mgr Agnieszka Serwatka /

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 6.10.2023

Podpis promotora 

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 6.10.2023

Podpis autora pracy 

Streszczenie

Kompleksowa analiza zmienności genetycznej polskiej populacji sokoła wędrownego (*Falco peregrinus*)

W pracy poddano analizie 465 prób zebranych na przestrzeni lat 2008-2019. Próby pochodziły od sokołów dzikich (n = 91), oraz z hodowli (n = 374). Wszystkie osobniki pochodzące z hodowli stanowiły materiał do reintrodukcji w polskim programie restytucji sokoła wędrownego. Pomimo pochodzenia z 64 różnych miejsc (hodowli/stanowisk lęgowych) na podstawie wyników analizy w programach STRUCTURE oraz STRUCTURE Harvester wykazano, że najbardziej zgodnym z danymi jest podział na dwie grupy. Badana grupa charakteryzuje się też niską heterozygotycznością, w przypadku każdego z 10 markerów heterozygotyczność oczekiwana była niższa od obserwowanej. Biorąc pod uwagę powyższe, można stwierdzić, że badana grupa charakteryzowała się niską zmiennością genetyczną. Ustalono również że struktura genetyczna badanych sokołów istotnie zmieniła się na przestrzeni lat 2013-2014. Na zmianę tą prawdopodobnie wpłynęły takie czynniki jak, zwiększone zapotrzebowanie na ptaki, generowane przez polski program reintrodukcji, reaktywacja niemieckich hodowli, oraz otwarcie się rynku Emiratów Arabskich na europejski rynek sokoła wędrownego.

Słowa kluczowe: sokół wędrowny, mikrosatelity, reintrodukcja, genetyka populacji

Summary

Comprehensive analysis of genetic variation in the Polish peregrine falcon population (*Falco peregrinus*)

The study included 465 samples, collected between 2008 and 2019. Samples came from wild falcons (n = 91) and captive-bred falcons (n = 374). All captive-bred specimens formed the reintroduction material in the Polish peregrine falcon restoration program. Although, originating from 64 different sites (breeding/nesting sites) the results of the analysis in the STRUCTURE and STRUCTURE Harvester programs showed that the division into two groups is the most consistent with the data. The studied group is also characterized by low heterozygosity, as for each of the 10 markers, the expected heterozygosity was lower than the observed one. It might be concluded that the studied group is characterized by low genetic variability. It was also found that the genetic structure of the studied falcons changed significantly in 2013-2014. This change was probably influenced by factors such as the increased demand for birds due to the Polish reintroduction program, the reactivation of German breeding and the opening of the Arab Emirates market for the European peregrine falcon.

Key words: peregrine falcon, microsatellites, reintroduction, population genetics

Spis treści

Wstęp	11
Sokół wędrowny <i>Falco peregrinus</i>	11
Markery mikrosatelitarne	15
Cel i zakres pracy	17
Hipoteza badawcza	18
Materiał i metodyka	19
Materiał	19
Metodyka.....	20
Genotypowanie.....	20
Analizy statystyczne	21
Syntetyczne omówienie publikacji	22
Publikacja I.....	22
Publikacja II	28
Podsumowanie i wnioski	33
Literatura.....	34
Załączniki.....	37

Dysertacja obejmuje dwie powiązane ze sobą tematycznie publikacje, a jej celem jest ocena zmienności genetycznej polskiej populacji sokoła wędrownego, zarówno osobników dzikich, jak i hodowlanych przeznaczonych do reintrodukcji.

1. **Puchała K.O.**, Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2021, Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland, *Genes*, 12, 666.
100 pkt MNiE, IF= 3.5
Udział własny: 81%
2. **Puchała K.O.**, Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2022, Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population, *Genes*, 13, 1487.
100 pkt MNiE, IF= 3.5
Udział własny: 81%

Łączna liczba punktów wg listy MNiE: 200

Łączna wartość współczynnika IF: 7

Wstęp

Sokół wędrowny *Falco peregrinus*

Zasięg występowania sokoła wędrownego obejmuje niemal cały świat, z wyjątkiem: Antarktydy, regionów pustynnych i części Ameryki Południowej (Nesje i wsp. 2000b, 2000c, Bell i wsp. 2014). U sokoła wędrownego występuje dymorfizm płciowy, objawia się on większym rozmiarem ciała samic od samców, samice mają większą rozpiętość skrzydeł oraz dłuższy tułów, występuje również różnica wielkości między podgatunkami zamieszkującymi różne obszary geograficzne. Sokół wędrowny to gatunek późno dojrzewający, samice osiągają dojrzałość rozrodczą w wieku 3 lat natomiast samce w wieku 2 lat (Zawadzka 2017; Kruszewicz 2016). Sokoły osiedlają się zazwyczaj w miejscach podobnych pod kątem ukształtowania terenu oraz rodzaju siedliska do miejsca wyklucia, a mechanizm ten zwany jest z angielskiego „imprinting”, czyli wdrukowanie. Mechanizm ten polega na tym, że potomstwo do gniazdowania wybiera tereny podobne do tych, na których gniazdowali rodzice. Osobniki wyklute w gniazdach znajdujących się na drzewach, będą poszukiwały miejsc gniazdowania na drzewach, natomiast osobniki pochodzące z terenów miejskich, będą poszukiwały miejsc gniazdowania na takich właśnie terenach (Sielicki i Sielicki, 2006).

W wyniku działalności człowieka, szczególnie polegającej na zastosowaniu DDT (dichlorodifenylotrichloroetan) w agrokulturze, w latach 60-tych XX wieku liczebność światowej populacji sokoła wędrownego drastycznie spadła, najbardziej ucierpiały populacje z Europy oraz Ameryki (Brown i wsp. 2007, Wegner i wsp. 2005, Crick i Ratcliffe 1995). Liczne badania potwierdziły, że akumulacja toksycznych związków w organizmach sokołów, w szczególności produktu rozpadu DDT - DDE (dichlorodifenyłodichloroetan), prowadziła do zmian w gospodarce wapniowej ptaków. Skutkiem akumulacji tego związku było pocienienie skorupki jaj do tego stopnia, że jaja zapadały się pod ciężarem dorosłego sokoła podczas wysiadywania. Powodem wysokiej akumulacji DDT w organizmach sokołów jest ich wysoki poziom troficzny. Sokoły jedzą ptaki, które z kolei odżywiają się owadami i nasionami z DDT. Powoduje to

akumulację pestycydu w organizmie sokołów, a w konsekwencji znacznie wyższe narażenie na ten związek sokołów w porównaniu do gatunków na niższych poziomach troficznych (Brown i wsp. 2007, Wegner i wsp. 2005, Crick i Ratcliffe 1995, Olsen i wsp. 1992). Zarówno zarodki, jak i dorosłe ptaki ginęły z powodu toksycznego stężenia HEOD (heksachloro-epoksy-oktahydro-dimetanonaftalen) będącego produktem rozpadu pestycydu aldrinu (Crick i Ratcliffe 1995).

Zaobserwowano, że wśród populacji, które doświadczyły dużego spadku liczebności spada również zmienność genetyczna, zjawisko to nazywane jest efektem wąskiego gardła i może mieć istotny wpływ na spadek zdolności przystosowawczych, a w konsekwencji zdolności do przeżycia. Sokoly wędrowne charakteryzują się ponadto innymi cechami podwyższającymi ryzyko wyginięcia, takim jak, małe zagęszczenie populacji, bycie drapieżnikiem wysokiego stopnia troficznego oraz relatywnie niskie tempo reprodukcji (Brown i wsp. 2007).

Zmniejszenia liczebności uniknęły jedynie populacje z podgatunku *F. p. palei* zamieszkujące klify. Miało to najprawdopodobniej związek z dietą tego podgatunku, który żywi się ptakami nadmorskimi niemającymi styczności ze związkami organochlorowymi, gdyż odżywiają się głównie kręgowcami i bezkręgowcami wodnymi (Brown i wsp. 2007). Na obszarze Europy, najmniejszej zmiany liczebności doświadczyła populacja zamieszkująca północną Szkocję (Crick i Ratcliffe 1995). W Europie kontynentalnej podgatunek *Falco peregrinus peregrinus* niemal wymarł, odnaleziono nieliczne osobniki w Alpach oraz Skandynawii. Całkowicie wyginął, charakteryzujący się gniazdowaniem na drzewach, unikalny ekotyp leśny, występujący jedynie w Europie centralnej oraz zachodniej Rosji (Brambilla i wsp. 2006, Sielicki i Sielicki 2009).

W związku z dramatycznym spadkiem liczebności sokołów wędrownych w Kanadzie i Stanach Zjednoczonych wprowadzono w latach 70-tych XX wieku ograniczenia w stosowaniu pestycydów zawierających związki organochlorowe. Dzięki opracowaniu w latach 60 XX wieku metod pozwalających na rozmnażanie sokołów w hodowli, możliwe było wprowadzenie programów reintrodukcji, czyli uwalniania sokołów pochodzących z hodowli do środowiska. Programy te odniosły sukces, w wielu krajach populacja sokoła wróciła do stanu

porównywalnego z początkiem XX wieku. Przykładem mogą być tu Stany Zjednoczone Ameryki oraz Kanada. Jednakże w obu tych krajach reintrodukcja przebiegała zgoła inaczej. W Stanach Zjednoczonych, celem zwiększenia różnorodności genetycznej, w reintrodukcji użyto materiału rodzicielskiego pochodzącego z 7 podgatunków *Falco peregrinus*, podczas gdy w Kanadzie użyto osobników podgatunku *F. p. anatum*, jedyne występującego tam naturalnie. Program restytucji poległ na odłowieniu sokołów, rozmnożenia ich w niewoli i ponownym wypuszczeniu do środowiska naturalnego. Uzyskane w ten sposób populacje charakteryzują się co prawda niezbyt dużą liczebnością, ale wykazują stabilność (Johnson i wsp. 2010, Brown i wsp. 2007). Jednakże, pomimo wprowadzenia ograniczeń w zastosowaniu pestycydów ze związkami organochlorowymi jeszcze w 2003 roku stwierdzono wysoki poziom tych związków w organizmach i jajach sokołów pochodzących z Grenlandii, miało to związek najprawdopodobniej z zimową migracją tych ptaków do Ameryki Południowej, gdzie środki te nadal pozostawały w użyciu (Vorkamp i wsp, 2009).

Również w Wielkiej Brytanii podjęto działania mające na celu uratowanie populacji sokołów wędrownych, wprowadzono ograniczenia w zastosowaniu pestycydów, a także rozpoczęto restytucję używając w tym celu materiału rodzicielskiego z podgatunków naturalnie zasiedlających Zjednoczone Królestwo. Program ten odniósł sukces, do tego stopnia, że w 1991 roku liczebność *Falco peregrinus* przewyższała liczebność tego gatunku z początku wieku, czyli sprzed załamania populacji (Banks i wsp. 2010, Verdejo i López-López 2008, Crick i Ratcliffe 1995). W następnej dekadzie liczba osobników nadal wzrastała (Banks i wsp. 2010). W Europie kontynentalnej reintrodukcję sokoła wędrownego, również rozpoczęto w latach 70-tych XX wieku, wykorzystując jako materiał rodzicielski sokoły z podgatunku *F. p. peregrinus* rozmnażane w hodowlach. Program ten odniósł sukces, populacja powróciła do stanu sprzed kryzysu wywołanego DDT (Verdejo i López-López 2008, Wegner i wsp 2005).

Na terenach Polski, sokół występował niezbyt licznie (Mizera i Sielicki 1995), w wyniku kryzysu związanego z DDT, ostatnia obserwacja gniazdowania tego gatunku miała miejsce w 1964 roku (Sielicki i Sielicki 2016), natomiast w latach

1970-1985 obserwowano jedną parę w Tatrzańskim Parku Narodowym (Cichocki 1986).

Na terenie Polski, sokoły wędrowne były z sukcesem rozmnażane w hodowlach od połowy lat 80-tych jednak program restytucji rozpoczęto w latach 90-tych XX wieku. W pierwszym okresie reintrodukcji (w latach 1990-1994) do środowiska wypuszczono 51 osobników (Wiśniewski 1995), w kolejnych latach, do 2009 roku, reintrodukowano łącznie 345 osobników. W roku 2010 prowadzenie programu zostało powierzone Stowarzyszeniu na Rzecz Dzikich Zwierząt „Sokół” i w latach 2010-2021 stowarzyszenie we współpracy hodowcami wypuściło do środowiska 879 osobników. W latach, z których pochodzą próby analizowane w badaniach będących podstawą tej dysertacji liczba wsiedlanych osobników przedstawiona jest w tabeli 1.

Tabela 1. Liczba osobników sokoła wędrownego wsiedlonych w latach 2008-2019 w Polsce

Rok	Liczba osobników
2008	23
2009	3
2010	56
2011	66
2012	75
2013	142
2014	129
2015	76
2016	38
2017	52
2018	78
2019	55

W polskim programie reintrodukcji sokoły były wsiedlane głównie na obszarach leśnych, ale również w obszarach górskich (Pieninach) oraz obszarach miejskich (Warszawa, Kraków). Charakterystyka wsiedleń wynika bezpośrednio z historii gatunku na ziemiach Polski, nasz kraj zamieszkiwały głównie osobniki będące przedstawicielami ekotypu leśnego. Obecnie mówi się o dwóch ekotypach sokoła, do ekotypu miejskiego, który występuje najszerzej,

zaliczamy te osobniki które gniazdują w miejscach przypominających zbocza gór, czy też klify, takie jak drapacze chmur, czy wysokie kominy. Do ekotypu leśnego zaliczamy natomiast osobniki gniazdujące na drzewach. Oba ekotypy różni preferencja do zajmowanego siedliska, brak jest dowodów na różnice fenotypowe oraz genetyczne pomiędzy ekotypami (Ławicki i Sielicki 2019, Sielicki i Sielicki 2016). Pierwszy odnotowany sukces rozrodczy pary na wolności miał miejsce w 1999 roku w Warszawie. W 2012 roku odnotowano pierwsze wyklucie piskląt w gnieździe znajdującym się na drzewie. W 2015 roku na terenie Polski znajdowało się 5 gniazd nadrzewnych. Szacunkowo każdego roku w Polsce przybywa od 1 do 3 par rozrodczych sokołów wędrownych. Globalna populacja sokoła jest sklasyfikowana według IUCN (Międzynarodowa Unia Ochrony Przyrody) w kategorii NT (najmniejszej troski), jednakże, na terenie Polski, populacja sokoła wciąż jest mało liczna i gatunek ma statut narażonego na wyginięcie (według Polskiej czerwonej księgi) (Sielicki i Sielicki 2016, 2009, 2006). Wciąż trwa również program reintrodukcji sokoła na terenie naszego kraju obecnie wysiłki skupiają się głównie na odtworzeniu populacji ekotypu leśnego.

Markery mikrosatelitarne

Mikrosatelity to krótkie, tandemowe powtórzenia sekwencji nukleotydowej występujące w genomie organizmów eukariotycznych, charakteryzujące się dużym polimorfizmem (występowaniem wielu form w tym samym *locus*). Analiza mikrosatelit znajduje szerokie zastosowanie w filogenetyce, genetyce populacji oraz hodowli zwierząt. Mikrosatelity mogą być używane w rozróżnianiu gatunków oraz podgatunków ptaków (Putanova i wsp. 2004). Stosowana jest między innymi do oceny różnorodności genetycznej zarówno populacji jak i między gatunkami (Ortego i wsp. 2008).

W 1995 roku Oetting i wsp. z powodzeniem zastosowali mikrosatelity w badaniu rodzicielstwa u ludzi. Znalazły one też zastosowanie jako markery płci u sokołów, w tym sokoła wędrownego. Mikrosatelity zostały wykorzystane również, w analizie struktury genetycznej populacji sokoła wędrownego (Nesje i Roed 2000a, Nesje i wsp. 2000b, 2000c). Nittinger i wsp. (2007) użyli

mikrosatelit w połączeniu z sekwencjonowaniem mitochondrialnego regionu kontrolnego do zbadania struktury genetycznej populacji raroga zwyczajnego (*Falco cherrung*). Mikrosatelity znalazły również zastosowanie w analizie zmienności genetycznej kanadyjskiej populacji sokoła wędrownego, a także w badaniu różnic genetycznych między osobnikami pochodzącymi z niewoli a dzikimi dwóch gatunków zamieszkujących Czechy, raroga zwyczajnego oraz sokoła wędrownego (Bryndova i wsp. 2012, Brown i wsp. 2007). Analiza mikrosatelit, dostarczyła również dowodów, na powrót do stanu równowagi populacji pustułki seszelskiej, która, podobnie jak sokół wędrowny doświadczyła efektu wąskiego gardła (Groombridge i wsp. 2009). Jacobsen i wsp. (2008) zastosowali mikrosatelity do zbadania różnorodności genetycznej sokołów wędrownych zasiedlających południowa Skandynawię. Mikrosatelity zostały również wykorzystane w badaniach nad innymi zagrożonymi gatunkami ptaków, takimi jak orzeł iberyjski (*Aquila adalberti*), czy orzełek włochaty (*Hieraetus pennatus*) (Martinez-Cruz i wsp. 2002). Analiza mikrosatelit w połączeniu z sekwencjonowaniem regionu kontrolnego DNA mitochondrialnego pozwoliła na stwierdzenie małej zmienności genetycznej wśród sokołów wędrownych zamieszkujących wyspy Fidżi (Talbot i wsp. 2011).

Cel i zakres pracy

Celem pracy doktorskiej, jest określenie zmienności genetycznej polskiej populacji sokoła wędrownego, z uwzględnieniem zarówno osobników dzikich jak i osobników z hodowli przeznaczonych do reintrodukcji w latach 2008-2019 (z wyłączeniem roku 2009).

Zakres pracy obejmował dwa etapy:

Etap I. Ocena zmienności genetycznej osobników reintrodukowanych oraz dzikich

Publikacja I:

Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2021, Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland, *Genes*, 12, 666; IF=4.141

Etap II. Ocena wpływu reintrodukcji i związanego z nią zwiększonego zapotrzebowania na ptaki na strukturę genetyczną osobników dostarczanych z hodowli.

Publikacja II:

Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2022, Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population, *Genes*, 13, 1487; IF=4.141

Hipoteza badawcza

Polska populacja sokoła wędrownego charakteryzuje się niską zmiennością genetyczną. Właściwy dobór osobników z hodowli może wpłynąć na wzrost zmienności genetycznej.

Materiał i metodyka

Materiał

Materiał badawczy stanowiły próby krwi pełnej pobrane z żyły znajdującej się w skrzydle przy pomocy igły (numery pozwoleń komisji bioetycznej 3181/2015 i 3445/2015). Próby były przechowywane w 96% etanolu. W wyjątkowych przypadkach (zbyt małych rozmiarów osobnik) pobierano pióra, które również były przechowywane w etanolu. Próby pochodziły od osobników dzikich ($n = 91$), oraz od osobników hodowlanych ($n = 374$), uwolnionych do środowiska w ramach programu reintrodukcji. Osobniki hodowlane zostały pozyskane z 47 hodowli znajdujących się na terenie 6 krajów. Osobniki dzikie reprezentowały zarówno ekotyp gniazdujący na drzewach ($n = 34$) oraz ekotyp miejski ($n = 57$). W tabeli 2 przedstawiono liczebność prób zależnie od miejsca pochodzenia.

Tabela 2. Liczba prób względem miejsca pochodzenia

Miejsce pochodzenia	Liczba osobników
Polska hodowlane	127
Polska dzikie	91
Czechy	117
Niemcy	79
Słowacja	38
Dania	10
Holandia	3

Materiał genetyczny w postaci DNA (kwasu deoksyrybonukleinowego) został wyizolowany przy pomocy NucleoSpin Tissue mini kit (Macherey-Nagel, Düren, Niemcy) zgodnie z protokołem producenta. W przypadku DNA izolowanego z piór wydłużono inkubację z proteinazą do 12 godzin.

Metodyka

Genotypowanie

Osobniki zostały zgenotypowane przy wykorzystaniu panelu składającego się z 10 markerów mikrosatelitarnych opisanych w literaturze zarówno dla sokoła wędrownego, jak i innych gatunków sokołów. Startery służące do namnożenia fragmentów mikrosatelitarnych zostały wyznakowane znacznikami fluorescencyjnymi (tabela 3), w celu umożliwienia przeprowadzenia reakcji Multiplex PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy).

Tabela 3 Zastosowane markery mikrosatelitarne, użyty barwnik fluorescencyjny oraz objętość starterów

Nazwa markera	Barwnik fluorescencyjny	Objętość starterów (μl)
NVHfp5	VIC	0.056
NVHfp13	6-FAM	0.056
NVHfp46_1	VIC	0.05
NVHfp54	PET	0.070
NVHfp79_4	6-FAM	0.056
NVHfp82_2	VIC	0.042
NVHfp86_2	PET	0.105
NVHfp89	6-FAM	0.056
NVHfp92	NED	0.056
NVMfp107	NED	0.042

Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej PCR jednej próby wynosiła 7μl. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: DNA 1μl, Master Mix 3,5μl, Q-solution (Qiagen®) 0,35μl, H₂O 0.93μl, mieszanina starterów w objętościach równych dla startera forward i reverse (koncentracja 100pm/μl) objętości dla poszczególnych markerów zostały podane w tabeli 3.

Reakcja została przeprowadzona w termocyklerze Biometra T3 w następujących warunkach: 14,5 min 95°C, przez 15 cykli: 30 s 95°C, 30 s 58°C obniżane o 0,2°C w

każdym cyklu, 1 min 72°C, następnie przez 20 cykli: 30 s 95°C, 30 s 55°C, 1 min 72°C, po zakończeniu 30 min 60°C. Następnie do wyjęcia z termocyklera 4°C.

Otrzymane produkty PCR były mieszane z formamidem oraz standardem masy, a następnie wizualizowane z użyciem analizera ABI3500 DNA. Długości fragmentów były określane przy użyciu oprogramowania GENEMAPPER 4.0.

Analizy statystyczne

Przy użyciu oprogramowania GenAlEx v6.5 sprawdzono czy badane populacje są w równowadze Hardy'ego-Weinberga. Przy pomocy tego samego programu oraz programu Microsoft Excel 2016 v16 .0 przeprowadzono analizy obejmujące: porównanie genotypów, obliczenie heterozygotyczności i liczby alleli, oszacowanie oczekiwanej heterozygotyczności i efektywnej liczby alleli. Przy pomocy oprogramowania Cervus 3.0.7 oszacowano prawdopodobieństwa wystąpienia alleli zerowych.

Przy użyciu programu GenAlEx obliczono dystans genetyczny pomiędzy populacjami wykorzystując metodę Nei'a. W etapie 1 wykonano również analizę Głównych Składowych (PCoA), bazując na dystansie Nei'a, wyniki zwizualizowano z wykorzystaniem GenAlEx. Skonstruowano drzewa filogenetyczne wykorzystując metody UPGMA oraz Neighbor-Joining w programie MEGA X v10.2.4.

W programie STRUCTURE v2.3.4, przeprowadzono analizy z wykorzystaniem Bayesowskiej metody grupowania, dla K (założonej liczby grup) w zakresie 1-15. Wykonano po 3 powtórzenia dla każdej wartości K. Wybrana długość Burn-in Period wynosiła 50.000, a liczba powtórzeń próbkowania Monte Carlo łańcucha Markowa wynosiła 500.000. Wartości te zostały określone na podstawie badań wstępnych oraz literatury. Na podstawie otrzymanych wyników w programie STRUCTURE Harvester v0.6.94 wygenerowano wykresy Evanno, celem wskazania wartości K najlepiej pasującej do danych.

W Etapie 2 dodatkowo przeprowadzono analizy spokrewnienia i inbrodu przy użyciu GenAlEx oraz obliczono indeksy fiksacji. Wizualizację wykonano przy pomocy programu Excel. W związku z brakiem dostępu do rzetelnych danych rodowodowych dla gatunku, indeks fiksacji posłużył do oszacowania trendów powiązanych z inbredem w badanej grupie.

Syntetyczne omówienie publikacji

Publikacja I

Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2021, Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland, *Genes*, 12, 666

Cel pracy: porównanie osobników wolnożyjących z przeznaczonymi do reintrodukcji osobnikami hodowlanymi, określenie różnorodności genetycznej obu grup.

W badaniu uwzględniono 353 osobniki z 5 krajów: Polski (pochodzące z hodowli $n = 86$, dzikie $n = 91$), Czech ($n = 91$), Niemiec ($n = 54$), Słowacji ($n = 21$) oraz Danii ($n = 10$). Wszystkie osobniki pochodzące z hodowli były wykorzystane w programie reintrodukcji sokoła wędrownego w Polsce. Osobniki dzikie reprezentowały ekotyp leśny ($n = 34$) oraz miejski ($n = 57$). Ekotyp osobników został ustalony przez eksperta na podstawie miejsca gniazdowania.

W tabeli 4 przedstawiono podstawowe parametry opisujące zastosowane markery satelitarne dla wszystkich badanych osobników. 326 z 353 (~92%) osobników zostało zgenotypowanych we wszystkich badanych *loci*. Dla ogółu osobników liczba alleli stwierdzonych dla markera wahała się od 3 do 9 natomiast w grupach zależnie od pochodzenia (państwa) od 2 do 9. Marker NVHfp79_4 charakteryzował się zerową heterozygotycznością obserwowaną, został więc wykluczony z dalszych analiz.

Zbadana grupa ptaków charakteryzowała się większą liczbą alleli w 9 z 10 markerów, w porównaniu do grupy 88 osobników ze Skandynawii (Nesje i wsp. 2000), oraz niższą heterozygotycznością dla 8 z 10 markerów. W porównaniu do osobników pochodzących ze Skandynawii badanych przez Jacobsena i wsp. (2008) odpowiednio 38 prób muzealnych i kolekcjonerskich, 20 osobników z niewoli oraz 44 osobników dzikich. W porównaniu do populacji historycznej liczba alleli była większa w przypadku 6 z 10 markerów, oraz mniejsza dla 2 markerów. Heterozygotyczność obserwowana była niższa dla 7 markerów. W porównaniu do populacji hodowlanej i dzikiej, liczba alleli była wyższa dla 7 markerów, natomiast heterozygotyczność była niższa w przypadku 7

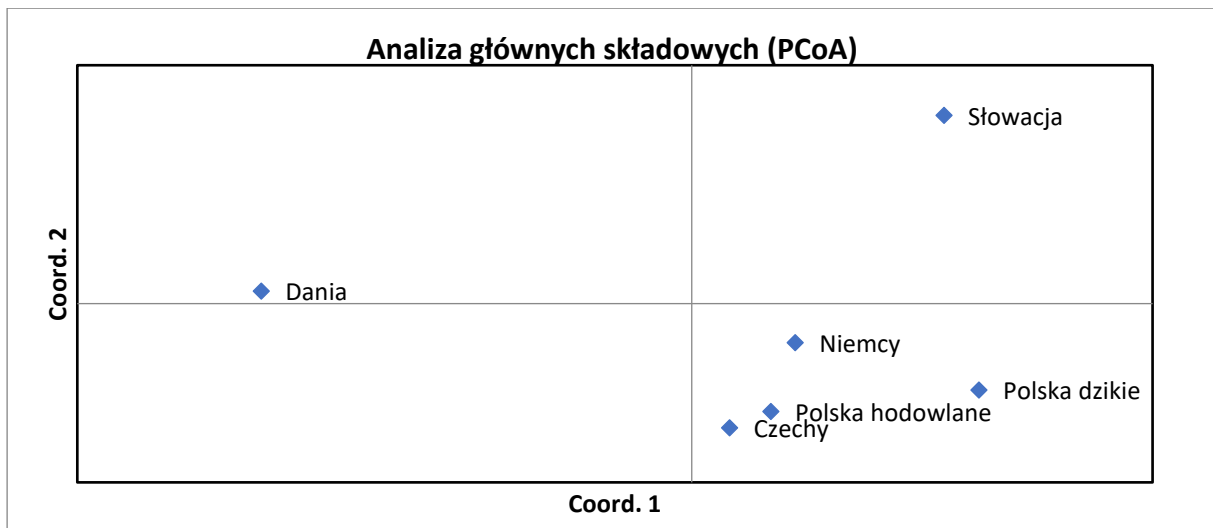
markerów. Znaczna część badanych ptaków (262 osobników; 74%) pochodziło z hodowli. Ingerencja człowieka polegająca na doborze prawdopodobnie przyczyniła się obserwowanej niskiej heterozygotyczności.

Tabela 4. Parametry opisujące zastosowane markery

Locus	Zakres Alleli	n	Na	Ne	Ho	He	F
NVHfp107	114–208	350	6	1.950	0.454	0.487	0.042
NVHfp13	93–103	350	9	4.714	0.554	0.788	0.030
NVHfp46_1	117–122	350	6	2.925	0.540	0.658	0.055
NVHfp5	104–108	352	3	1.489	0.057	0.328	0.159
NVHfp54	104–116	348	7	2.395	0.382	0.528	0.049
NVH79_4	104–142	352	3	1.982	0.000	0.495	0.029
NVHfp82_2	134–140	352	4	1.143	0.085	0.125	0.060
NVHfp86_2	140–145	343	5	2.146	0.370	0.534	0.045
NVHfp89	116–132	347	9	4.467	0.617	0.776	0.052
NVHfp92_1	110–130	349	9	2.617	0.298	0.618	0.075

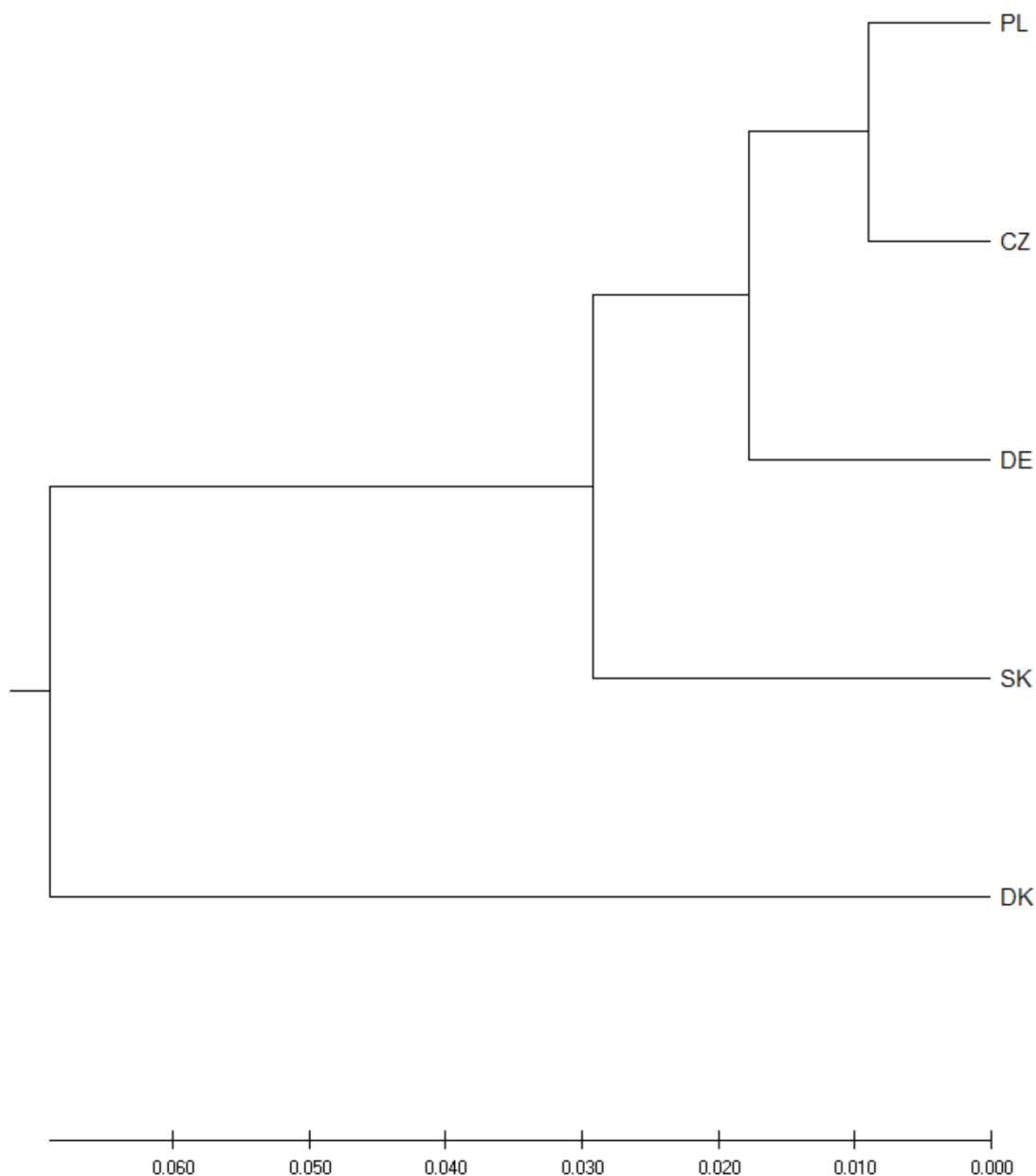
n – liczba osobników, Na – liczba obserwowanych alleli, Ne – Efektywna liczba alleli, Ho – obserwowana heterozygotyczność, He – oczekiwana heterozygotyczność, F – indeks fiksacji

Na rysunku 1 przedstawiono wynik analizy głównych składowych (PCoA) obrazujący dystans genetyczny między badanymi grupami ptaków. Składowa 1 i 2 tłumaczą 94,74% zmienności. Na podstawie tego wykresu można zauważyć, że osobniki hodowlane w Polsce pod względem genetycznym są najbardziej zbliżone do osobników pochodzących z Czech, natomiast najmniej do osobników z Danii i Słowacji. Osobniki dzikie natomiast najbardziej zbliżone są do osobników pochodzących z Polski oraz Niemiec. Spowodowane jest to działaniami reintrodukcyjnymi, w których niemieckie hodowle są jednym z największych dostawców ptaków (po hodowlach z Polski i Czech). Istotny wpływ na to, mogło mieć również lokalizacja terenów lęgowych z których pochodziły analizowane osobniki, 11 z 18 lokalizacji znajdowało się na terenach zachodniej Polski, w niewielkiej odległości od granicy. Biorąc pod uwagę zasięg przemieszczania się sokołów, oraz fakt, że sokoły przed osiągnięciem dojrzałości płciowej pokonują często relatywnie duże dystanse, przed wybraniem miejsca gniazdowania, przybywanie sokołów z Niemiec i łączenie się w pary z sokołami z Polski jest wysoce prawdopodobne.



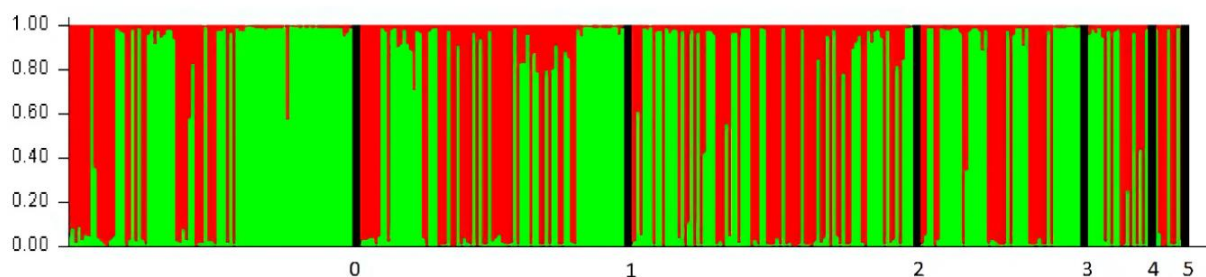
Rysunek 1. Analiza głównych składowych dla dystansów genetycznych między ptakami pochodzącymi z różnych krajów

Wnioski te potwierdza również drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie dystansu genetycznego Nei'a metodą UPGMA, przedstawione na rysunku 2. Osobniki z Polski i Czech znajdują się najbliżej siebie, osobniki pochodzące z Danii są najbardziej oddalone od pozostałych. Obrazuje to transfery ptaków między hodowcami. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w informacjach uzyskanych od hodowców.



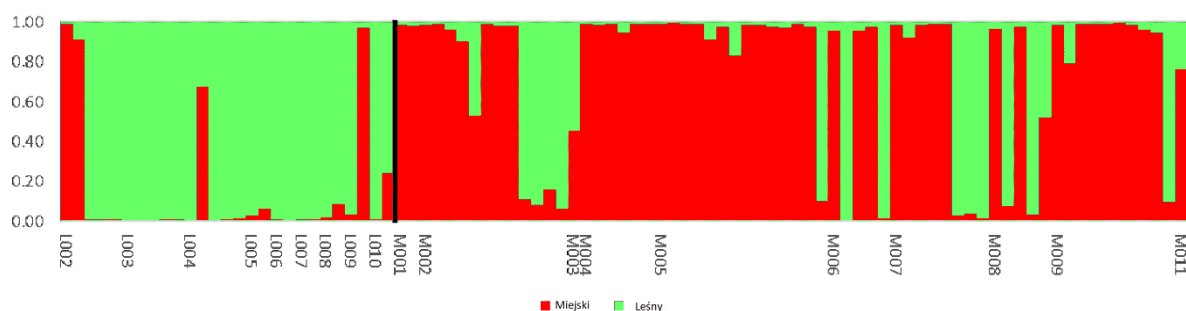
Rysunek 2. Drzewo filogenetyczne obrazujące dystans pomiędzy ptakami pochodzącymi z poszczególnych krajów. Jest to optymalne drzewo o sumie długości gałęzi wynoszącej 0.19396867

Pomimo tego, że badane osobniki pochodziły z 5 krajów, analiza wyników otrzymanych z programu STRUCTURE w programie STRUCTURE Harvester wykazała, że najbardziej pasującym do danych podziałem, jest podział na dwie grupy ($K = 2$). Na rysunku 3 przedstawiono wykres uzyskany w programie STRUCTURE. Kraj pochodzenia nie wydaje się wpływać na przyporządkowanie do grupy. Prawdopodobnie spowodowane jest to wymianą ptaków między europejskimi hodowcami, oraz naturalnie stosunkowo niską zmiennością genetyczną w obrębie gatunku.



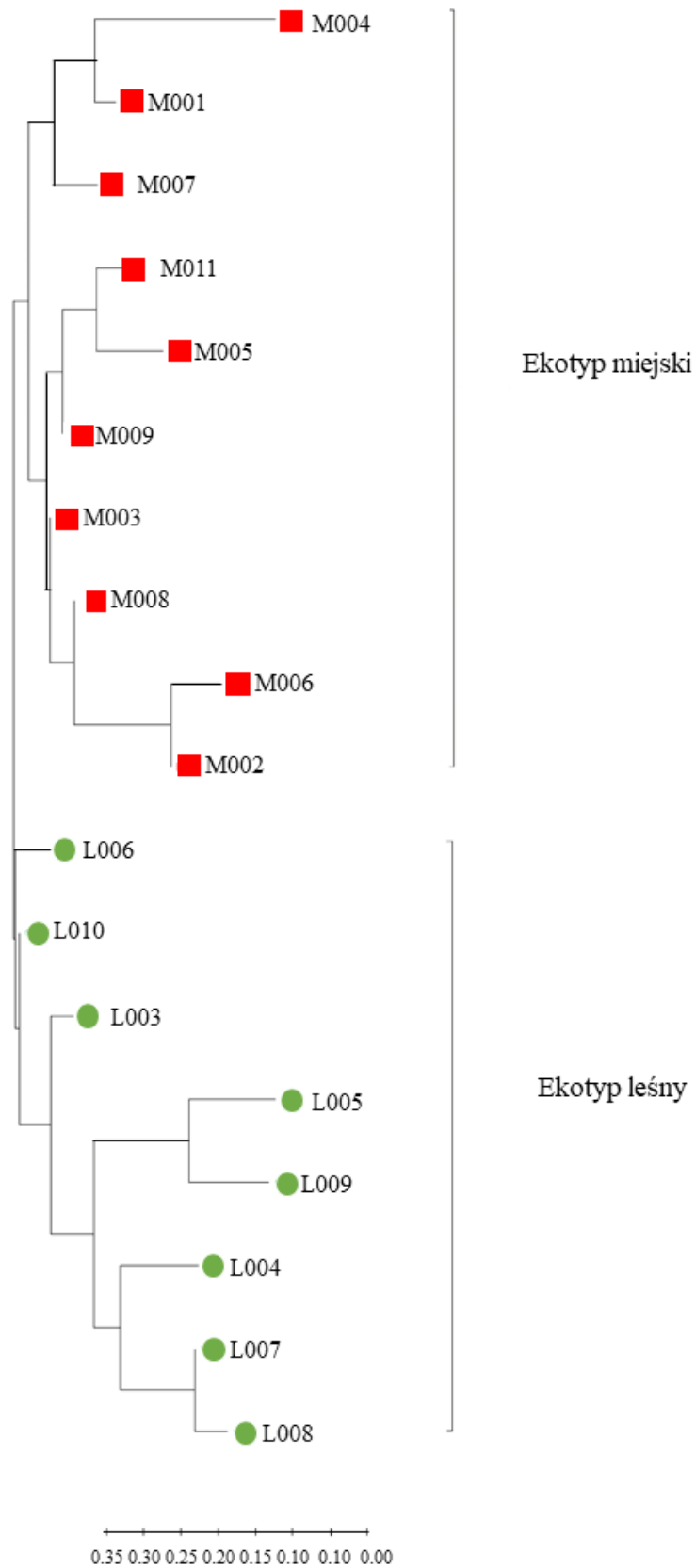
Rysunek 3. Wykres utworzony w programie STRUCTURE obrazujący przyporządkowanie do grup poszczególnych osobników. Każda kolumna reprezentuje pojedynczego osobnika, każdy kolor reprezentuje jedną z grup założonych przez program. 0 – Polska dzikie, 1 – Polska hodowlane, 2 – Czechi, 3 – Niemcy, 4 – Słowacja, 5 – Dania.

Analogiczne analizy zostały przeprowadzone dla osobników dzikich. Również w tym przypadku liczba grup najlepiej odpowiadająca danym wynosiła $K = 2$. Na rysunku 4 przedstawiono wykres z programu STRUCTURE. 40 z 57 (~70%) osobników ekotypu miejskiego segregowało do grupy 1, 23 z 34 (~67,6%) osobników ekotypu leśnego segregowało do grupy 2. Różnica w przyporządkowaniu do grupy wynika raczej z izolacji, niż faktycznej różnicy genetycznej, pomiędzy oboma ekotypami. W wyniku zjawiska wdrukowania nawet stosunkowo blisko od siebie położone lokalizacje zasiedlane przez różne ekotypy są efektywnie izolowane, ze względu na to, że osobniki zależnie od ekotypu, mają tendencję do gniazdowania na odmiennych terenach. Za brakiem różnic genetycznych przemawia brak zidentyfikowanych alleli prywatnych, specyficznych dla ekotypu. Co więcej, istniejąca różnica może zostać zatarta, w wyniku prowadzonej reintrodukcji gatunku.



Rysunek 4. Wykres z programu STRUCTURE obrazujący przyporządkowanie do grup poszczególnych osobników. Każda kolumna reprezentuje jednego osobnika, a każdy kolor reprezentuje jedną grupę. Osobniki zostały pogrupowane według ekotypu i miejsca gniazdowania: M – gniazdo miejskie, L – gniazdo leśne.

Podział na grupy jest również widoczny na drzewie filogenetycznym skonstruowanym dla osobników dzikich z podziałem na gniazda (Rysunek 5). Na przedstawionym rysunku, wyraźnie widać podział na ekotypy.



Rysunek 5. Drzewo filogenetyczne obrazujące dystans genetyczny Nei'a z podziałem na gniazda i ekotypy. Drzewo zostało skonstruowane przy użyciu algorytmu Neighbor-Joining. Jest to optymalne drzewo dla którego suma długości gałęzi wynosi 157,714,544. M – gniazdo miejskie, L – gniazdo leśne.

Puchala K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2021, Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population, Genes, 13, 1487

Cel pracy: Oszacowanie zmian w strukturze genetycznej sokołów pochodzących z hodowli, będących materiałem dla polskiego programu reintrodukcji sokoła wędrownego.

W tym badaniu uwzględniono 374 osobniki hodowlane przeznaczone do reintrodukcji w Polsce na przestrzeni lat 2008,2010-2019, stanowiły one około 47% wszystkich osobników wypuszczonych do środowiska na przestrzeni tych lat. Ptaki pochodziły z Polski (n = 127), Czech (n = 117), Niemiec (n = 79), Słowacji (n = 38), Danii (n = 10) oraz Holandii (n = 3). Badanie zostało podzielone na dwa etapy, w pierwszym analizowano wszystkie próby, w drugim tylko próby pochodzące od 6 największych (względem liczby dostarczonych ptaków) hodowców (n = 170). Rozkład prób w latach prezentowany jest w tabeli 5. Najwięksi hodowcy pochodzili z Niemiec (n = 1), Słowacji (n = 1), Czech (n = 2) i Polski (n = 2).

Tabela 5. Liczba prób z podziałem na lata

Rok	Liczba prób
2008	11
2010	46
2011	53
2012	73
2013	65
2014	43
2015	35
2016	6
2017	16
2018	18
2019	8

Osobniki zostały zgenotypowane w 9 loci mikrosatelitarnych, dla 347 z 374 (~93%) osobników uzyskano pełne genotypy w badanych loci. Podstawowe parametry opisujące zastosowane markery zostały przedstawione w tabeli 6. Index fiksacji dla wszystkich prób wynosił 0.409.

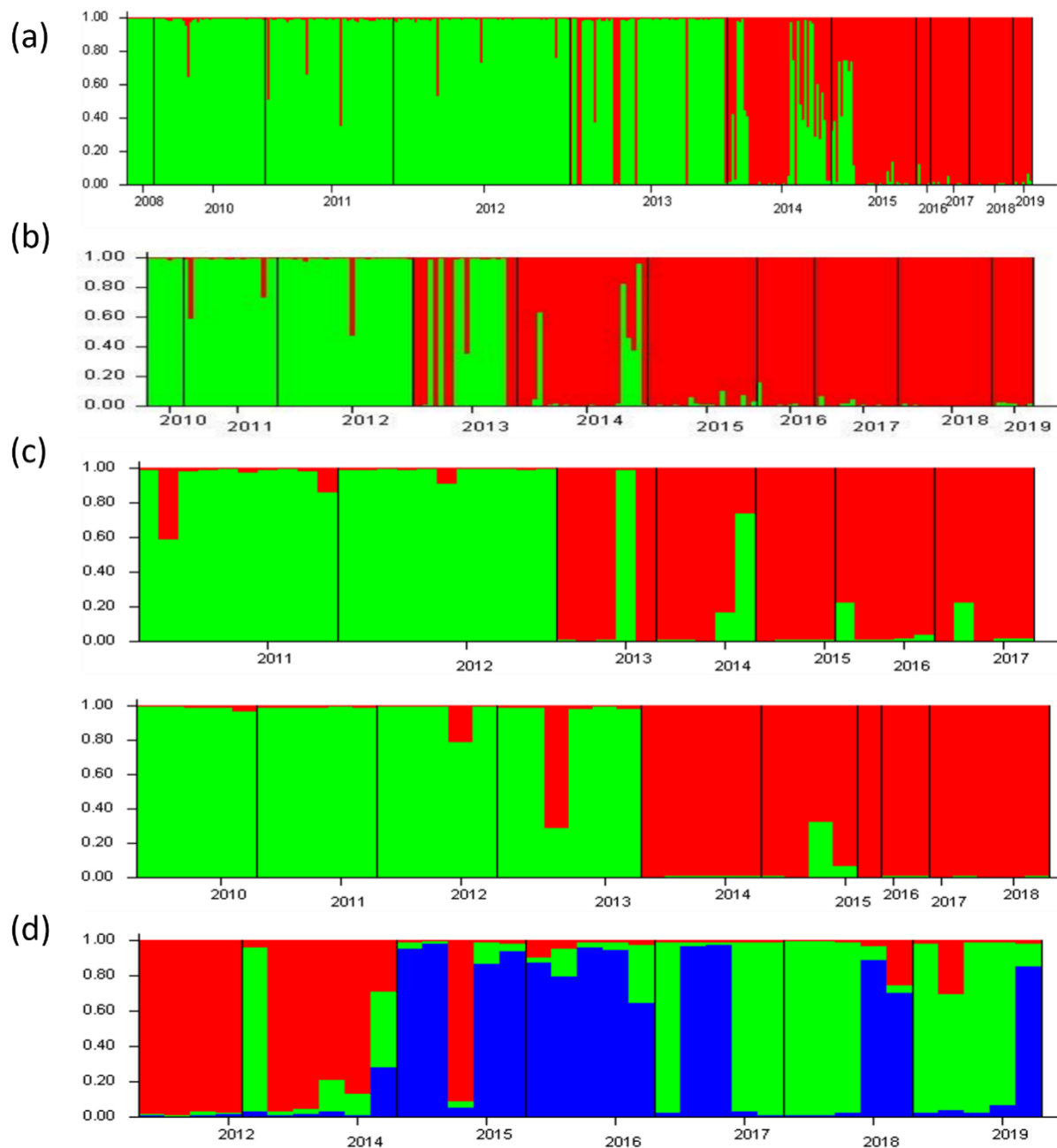
Tabela 6. Parametry opisujące zastosowane markery

Locus	Zakres Alleli	n	Na	Ne	Ho	He	F
NVHfp107	203–208	373	4	2.082	0.466	0.520	0.102
NVHfp13	93–103	373	9	4.654	0.488	0.785	0.379
NVHfp46_1	117–122	373	6	4.129	0.539	0.758	0.289
NVHfp5	102–108	374	5	1.462	0.070	0.316	0.780
NVHfp54	104–208	369	9	2.487	0.428	0.598	0.284
NVHfp82_2	134–140	373	5	1.648	0.137	0.393	0.652
NVHfp86_2	140–145	368	5	3.453	0.351	0.710	0.507
NVHfp89	116–132	367	9	4.831	0.569	0.793	0.282
NVHfp92_1	110–126	365	7	3.011	0.288	0.668	0.569

n – liczba osobników, Na – liczba obserwowanych alleli, Ne – efektywna liczba alleli, Ho – obserwowana heterozygotyczność, He – oczekiwana heterozygotyczność, F – indeks fiksacji

Podobnie jak w poprzedniej pracy również w tym przypadku w analizie danych w programie STRUCTURE Harvester wykazano, że najprawdopodobniejszym podziałem w obrębie badanej puli osobników jest podział na dwie grupy ($K = 2$). Na rysunku 6 przedstawiono 5 wykresów, obrazujących zmianę struktury genetycznej osobników dostarczanych w kolejnych latach. Na wszystkich wykresach można zauważyć zmianę struktury genetycznej na przełomie 2013 i 2014 roku, osobniki dostarczane przed rokiem 2013 segregowane były niemal wyłącznie do grupy 1, podczas gdy osobniki dostarczane po tym roku segregowane były głównie do grupy 2. Przyczyny takiego stanu rzeczy można upatrywać w dwóch wydarzeniach, mających wpływ na hodowlę sokoła w Polsce i Europie. Po pierwsze znaczne zwiększenie intensywności reintrodukcji w Polsce od roku 2010, stworzyło zapotrzebowanie na relatywnie dużą liczbę ptaków, w latach 2010-2015 wypuszczono do środowiska 550 ptaków, więcej niż przez wcześniejsze 20 lat programu reintrodukcji. W latach 2008-2019 łącznie były to 793 osobniki. Takie stałe zapotrzebowanie pozwoliło hodowcom biorącym udział w programie, na powiększanie swoich hodowli. Również w związku z polskim programem reaktywowane zostały hodowle niemieckie, wcześniej wygaszane ze

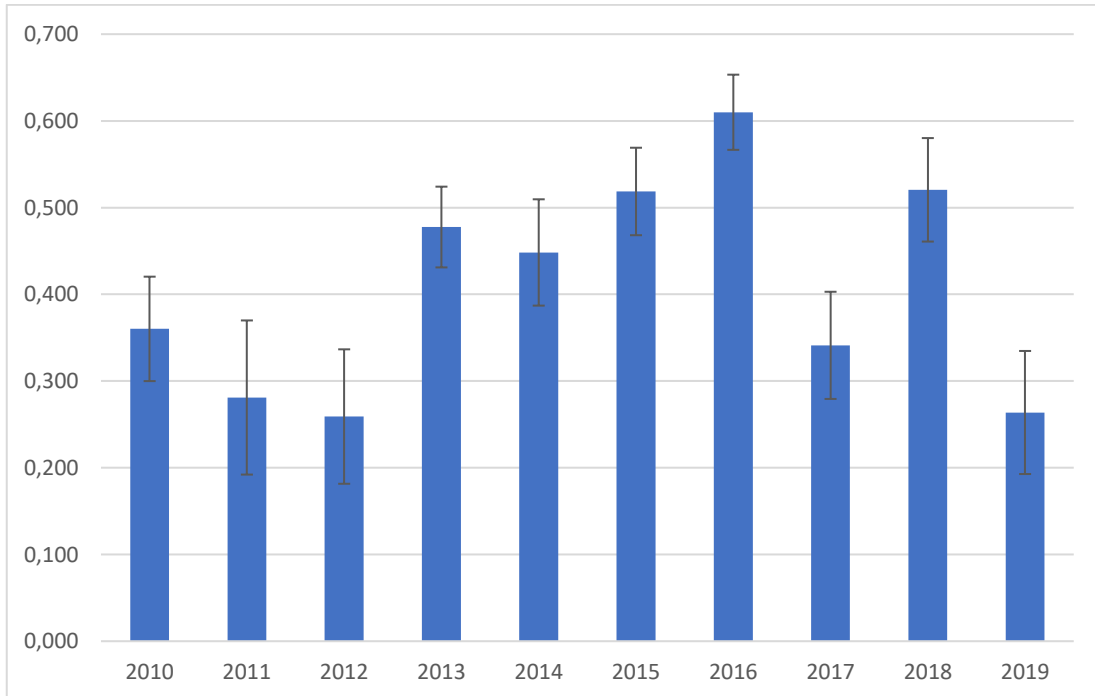
względem na zakończenie reintrodukcji w Niemczech. Prawdopodobnie nie bez znaczenia było również otwarcie rynku Arabii Saudyjskiej na sokoły pochodzące z Europy. Wszystkie te wydarzenia, spowodowały, że hodowcy mieli środki, aby zintensyfikować wymianę ptaków pomiędzy hodowlami, co doprowadziło do zmian struktury genetycznej ptaków otrzymywanych z hodowli.



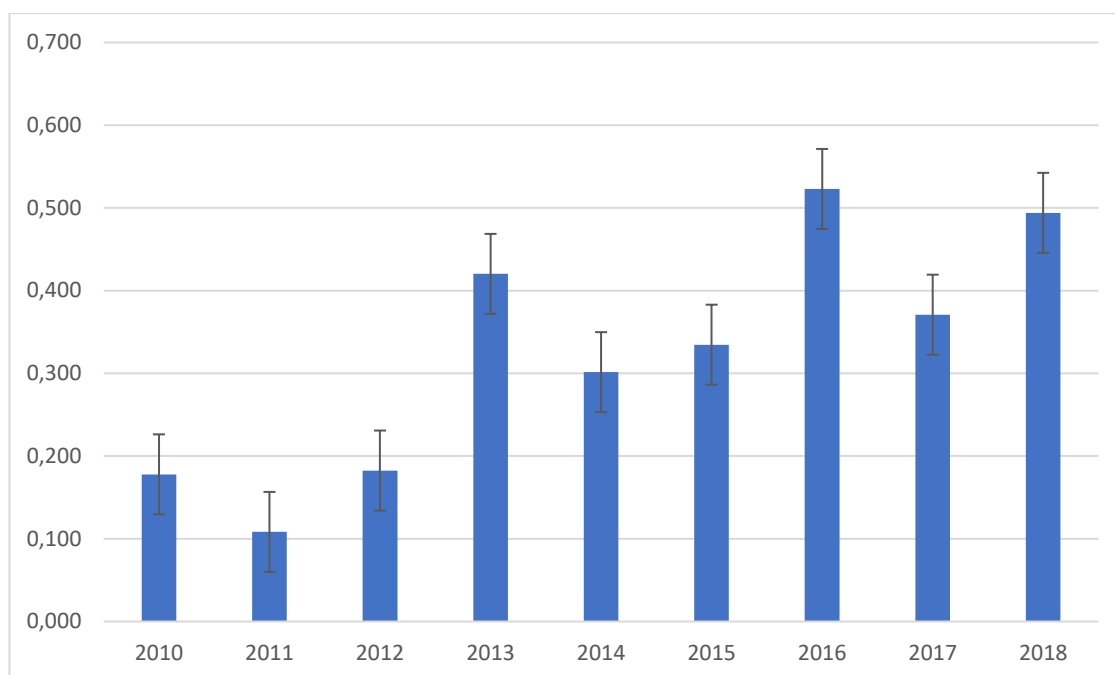
Rysunek 6. Wykresy otrzymane w programie STRUCTURE obrazujące obliczoną przynależność do grup. Każda kolumna reprezentuje jednego osobnika, a każdy grupę genetyczną. Osobniki zostały uszeregowane według roku pobrania materiału. **(a)** wszystkie osobniki, $K = 2$; **(b)** osobniki od głównych hodowców, $K = 2$; **(c)** osobniki od hodowcy 1 ($n = 45$) i osobniki od hodowcy 3 ($n = 38$), $K = 2$; **(d)** osobniki od hodowcy 6 ($n = 35$), $K = 3$
 Indeks fiksacji służy do określenia zmian w poziomie inbrodu w latach (Rysunek 7).

Widoczny jest skokowy wzrost tego parametru w roku 2013. Najwyższy poziom inbredu stwierdzono w 2016 roku, jednakże był to również rok, dla którego zebrano najmniej prób, co mogło mieć wpływ na wielkość tego parametru. Podobny wynik uzyskano, gdy w analizie uwzględniono tylko osobniki pochodzące od 6 największych hodowców (Rysunek 8), przy czym z powodu braku prób wykluczone zostały lata 2016 i 2019.

Trend wzrostowy, widoczny na obu wykresach, może być związany z intensyfikacją pracy hodowlanej wynikającej ze zwiększonego zapotrzebowania na ptaki. Hodowcy mogą realizować rozwój na dwa sposoby, kupując ptaki od innych hodowców, co wiąże się z nieraz stosunkowo wysokimi kosztami, lub zasilając hodowlę potomstwem własnych ptaków. Użycie własnych ptaków generuje niższe koszty dla hodowcy, może mieć jednak negatywny wpływ na różnorodność genetyczną w hodowli. Nie bez znaczenia pozostaje też tendencja hodowców do wzmacniania niektórych z cech ptaków, do rozrodu trafiają więc ptaki prezentujące pożądany poziom tych cech (np. szybkość lotu, łowność itp.). Taka nienaturalna selekcja i dobór mogą wpływać na wzrost inbredu osobników otrzymywanych w wyniku prac hodowlanych.



Rysunek 7. Średnia wartość parametru F, w badanych latach dla wszystkich badanych osobników



Rysunek 8. Średnia wartość parametru F, na przestrzeni lat, dla osobników pochodzących z 6 największych hodowli

Podsumowanie i wnioski

1. Badana grupa sokołów wędrownych charakteryzuje się stosunkowo niską heterozygotycznością, dla każdego z badanych markerów w obu badaniach heterozygotyczność obserwowana była niższa niż oczekiwana.
2. Struktura genetyczna osobników ekotypu leśnego różniła się od struktury genetycznej osobników ekotypu miejskiego. Różnice te mogą być wzmocnione, lub zatarte, w efekcie prowadzonej reintrodukcji. Brak jest w tych populacjach alleli prywatnych, a opisane różnice dotyczą frekwencji występowania alleli, brak jest więc podstaw, by twierdzić, że ekotypy różnią się od siebie genetycznie.
3. Segregowanie osobników do jedynie dwóch grup, w obu badaniach, pomimo tego, że próby pochodziły z łącznie 6 krajów i 64 miejsc (hodowli/miejsc gniazdowania), wskazuje na niską zmienność genetyczną w obrębie badanej grupy osobników.
4. Rosnący trend indeksu fiksacji wskazuje na zwiększający się inbred osobników pochodzących z hodowli i powinien zostać odebrany jako ostrzeżenie. Hodowcy powinni poszukać nowych źródeł ptaków, by zwiększyć różnorodność genetyczną swoich hodowli.
5. Intensywność realizowanego programu reintrodukcji w połączeniu z innymi czynnikami wpłynęły na wzrost zapotrzebowania na ptaki z hodowli jak również na zmianę struktury genetycznej osobników pozyskiwanych z niewoli.

Literatura

1. Brambilla, M.; Rubolini, D.; Guidali, F. Factors affecting breeding habitat selection in a cliff-nesting peregrine *Falco peregrinus* population. *J. Ornithol.* 2006, 147, 428–435.
2. Brown, J.W.; Van Coeverden De Groot, P.J.; Birt, T.P.; Seutin, G.; Boag, P.T.; Friesen, V.L. Appraisal of the consequences of the DDT-induced bottleneck on the level and geographic distribution of neutral genetic variation in Canadian peregrine falcons, *Falco peregrinus*. *Mol. Ecol.* 2007, 16, 327–343.
3. Bryndová, M.; Putnová, L.; Bartoňová, P.; Kaplanová, K.; Urban, T. Genetic differences between wild and captive populations of the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and the saker falcon (*Falco cherrung*) living in the Czech Republic. *JAST-B* 2012, 2, 642–651.
4. Sielicki, S.; Sielicki, J. . Restoration of peregrine falcon in Poland 1989-2007. In *Peregrine falcon populations – status and perspectives in 21thcentury*, 1st ed.; Sielicki, J., Mizera, B., Eds.; Turul publishing and Poznań University of Life Sciences Press: Warsaw-Poznań, Poland, 2009; Volume 1, pp. 699–722.
5. Zawadzka D.; 2017; *Fauna Polski Ptaki*; MULTICO oficyna wydawnicza, ISBN 978-83-7763-353-3, 462-464
6. Kruszewicz A. G.; 2016; *Ptaki Polski Encyklopedia Ilustrowana*; MULTICO oficyna wydawnicza, ISBN 978-83-7763-391-5, 99
7. Nesj M., Røed K. H., Bell D. A., Lindberg P., Lifjeld J. T.; 2000b; Microsatellite analysis of population structure and genetic variability in peregrine falcons (*Falco peregrinus*); *Animal conservation* (3), 267–275.
8. Nesje M., Røed K. H., Lifjeld J. T., Lindberg P. , Steen O. F.; 2000c; Genetic relationships in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers; *Molecular Ecology* (9), 53–60.
9. Nesje M., Roed K. H.; 2000; Brief report Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers; *Hereditas* (132), 261–263.
10. Sielicki S., Sielicki J.; 2006; Restytucja sokoła wędrownego *Falco peregrinus* w Polsce. W: Anderwald D. (red.); *ochrona drapieżnych zwierząt. Poszukiwanie kompromisów. Stud. i mat. CEPL Rogów*, 2 (12), 133-148

11. Sielicki S., Sielicki J.; 2009; Populacja nadrzewna sokoła wędrownego *Falco peregrinus* w Europie i restytucja gatunku w Polsce; studia i materiały centrum edukacji przyrodniczo-leśnej (11), 67-85
12. Wegner P., Kleinstauber G., Baum F., Schilling F.; 2005; Long-term investigation of the degree of exposure of German peregrine falcons (*Falco peregrinus*) to damaging chemicals from the environment; J Ornithol. (146), 34-54
13. Crick H. Q. P., Ratcliffe D. A.; 1995; The peregrine falcon (*Falco peregrinus*) breeding population of the United Kingdom in 1991; Bird Study (42), 1-19
14. Olsen P., Emison B., Mooney N., Brothers N.; 1992; DDT and dieldrin: effects of resident Peregrine Falcon populations in south-eastern Australia; Ecotoxicology (1), 89-100
15. Jacobsen F., Nesje M., Bachmann L., Lifjeld J. T.; 2008; Significant genetic admixture after reintroduction of peregrine falcon (*Falco peregrinus*) in Southern Scandinavia; Conserv Genet (9), 581–591.
16. Johnson J. A., Talbot S. L., Sage G. K., Brunham K. K., Brown J. W., Maechtle T. L., Seegar W. S., Yates M. A., Anderson B., Mindell D. P.; 2010; The use of genetics for the management of a recovering population: temporal assessment of migratory peregrine falcons in NORTH America; PloS One (5)
17. Vorkamp K., Thomsen M., Moller S., Falk K., Sorensen P. B.; 2009; Persistent organochlorine compounds in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from South Greenland: levels and temporary changes between 1986 and 2003; Environ Int (35), 87-96
18. Banks A. N., Crick H. Q. P., Coombes R., Benn S. Ratcliffe D. A., Humphreys E. M.; 2010; The breeding status of peregrine falcons *Falco peregrinus* in the UK and Isle of Man in 2002; Bird study (57), 421-436
19. Verdejo J., López-López P.; 2008; Long-term monitoring of a peregrine falcon population: size, breeding performance and nest-site characteristic; Ardeola (55), 87-96
20. Mizera, T.; Sielicki, J. The peregrine falcon *Falco peregrinus* in Poland - its situation and perspectives for reinstatement. Acta Ornithol. 1995, 30, 47–52
21. Sielicki S., Sielicki J.; 2016; Falconry and the restoration of the peregrine falcon in Poland in 1990-2015; Falconry – its influence on biodiversity and cultural heritage, Supraśl
22. Cichocki W. Niektóre gatunki lęgowych ptaków w Tatrzańskim Parku Narodowym. Parki narodowe i rezerwaty przyrody 1986, 7, 57-62.

23. Wisniewski, G. Programme for the reinstatement of the peregrine falcon *Falco peregrinus* in Poland. *Acta Ornithol.* 1995, 30, 73–78.
24. Ławicki, Ł.; Sielicki, S. Restoration of the tree-nesting population of the peregrine falcon *Falco peregrinus* in Pomerania. *Ornis Pol.* 2019, 60, 75–84.
25. Putnova L., Pokoradi J., Civanova K., Urban T., Krizanova I., Kubek A., Dvorak J.; 2004; Genetic variability of falcon microsatellite DNA markers; 55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production in Slovenia, Bled (355)
26. Ortego J., González E. G., Sanchez-Barbudo I., Aparicio J. M., Cordero P. J.; 2007; Cross-amplified microsatellites for the lesser kestrel *Falco naumanni*; *Ardeola* (54), 101–108.
27. Oetting W. S., Lee H. K., Flanders D. J., Wiesner G. L., Sellers T. A., King R. A.; 1995; Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers; *Genomics* (30), 450–458.
28. Nittinger F., Gamauf A., Pinsker W., Wink M., Haring E.; 2007; Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data; *Molecular Ecology* (16) 1497–1517.
29. Groombridge J. J., Dawson D. A., Burke T., Prys-jones R., Brooke, M. L.; 2009; Evaluating the demographic history of the Seychelles kestrel (*Falco araea*): Genetic evidence for recovery from a population bottleneck following minimal conservation management.; *Biological Conservation*, 142(10), 2250–2257.
30. Martínez-cruz, B. M., David, V. A., Godoy, J. A., & Negro, J. J., O'braien S. J., Johnson W. E.; 2002; Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species; *Molecular Ecology Notes*, 16–19.
31. Talbot S. L., Palmer A. G., Sage G. K., Sonsthagen S. A., Swem T., Brimm D. J., White C. M.; 2011; Lack of genetic polymorphism among peregrine falcons *Falco peregrinus* of Fiji; *J. Avian Biol.* (42), *J. Avian Biol.* (42) 415–428.
32. Bell A. D., Griffiths S. C., Caballero C. I., Hartley R. R., Lawson R. H.; 2014; Genetic evidence for global dispersal in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and affinity with the taita falcon (*Falco fasciinucha*); *J. Raptor Res.*(48), 44–53
33. Verdejo J., López-López P.; 2008; Long-term monitoring of a peregrine falcon population: size, breeding performance and nest-site characteristic; *Ardeola* (55), 87–96

Załączniki

1. Oświadczenia o współautorstwie autorów publikacji 1
2. Publikacja 1 - **Puchała K.O.**, Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2021, Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland, *Genes*, 12, 666.
3. Oświadczenia o współautorstwie autorów publikacji 2
4. Publikacja 1 - **Puchała K.O.**, Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2022, Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population, *Genes*, 13, 1487.

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 28.08.2023

Karol Puchała

Górczewska 228/19 01-460 Warszawa


669544520

Karol.puchala2@gmail.com

Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2021, Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland, Genes, 12, 666 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na, opracowaniu metodologii, doborze oprogramowania, walidacji danych, analizie danych, napisaniu manuskryptu oraz wizualizacji danych, co stanowi 81% pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 21.08.2023 r

Zuzanna Nowak-Życzyńska

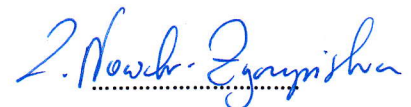
Marco Polo 1 m 40;
02-776 Warszawa

zuza.zyczynska@gmail.com

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2021, Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland, Genes, 12, 666 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na konceptualizacji, opracowaniu metodologii, walidacji danych, o cenie i edycji manuskryptu, administracji w projekcie, co stanowi 8% pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie


Warszawa, dn. 25-08-2023 r.

Sławomir Sielicki
ul. Sokolników 15
87-880 Brześć Kujawski
tel. 608 36 56 46
email: falco@peregrinus.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2021, Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland, Genes, 12, 666. Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu środków oraz materiału badawczego, zarządzaniu danymi, konceptualizacji, walidacji danych, administracji w projekcie, co stanowi 8 % pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 28.09.2023

Wanda Olech

Kopcińskiego 5 m 8, Warszawa

605095501

Wanda_olech@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie



Niniejszym oświadczam, że w pracy Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2021, Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland, Genes, 12, 666 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym, co stanowi 3 % pracy.



Podpis

Article

Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland

Karol O. Puchala ^{1,*} , Zuzanna Nowak-Życzynska ¹, Sławomir Sielicki ² and Wanda Olech ¹ 

¹ Department of Animal Genetics and Conservation, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warszawa, Poland; zuzanna_nowak_zyczynska@sggw.edu.pl (Z.N.-Ż.); wanda_olech@sggw.edu.pl (W.O.)
² Society for Wild Animals "Falcon", 87-800 Włocławek, Poland; falco@peregrinus.pl
* Correspondence: karol_puchala@sggw.edu.pl

Abstract: Microsatellite DNA analysis is a powerful tool for assessing population genetics. The main aim of this study was to assess the genetic potential of the peregrine falcon population covered by the restitution program. We characterized individuals from breeders that set their birds for release into the wild and birds that have been reintroduced in previous years. This was done using a well-known microsatellite panel designed for the peregrine falcon containing 10 markers. We calculated the genetic distance between individuals and populations using the UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) method and then performed a Principal Coordinates Analysis (PCoA) and constructed phylogenetic trees, to visualize the results. In addition, we used the Bayesian clustering method, assuming 1–15 hypothetical populations, to find the model that best fit the data. Units were segregated into groups regardless of the country of origin, and the number of alleles and observed heterozygosity were different in different breeding groups. The wild and captive populations were grouped independent of the original population.

Keywords: microsatellites; populational genetics; *Falco peregrinus*



Citation: Puchala, K.O.; Nowak-Życzynska, Z.; Sielicki, S.; Olech, W. Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland. *Genes* **2021**, *12*, 666. <https://doi.org/10.3390/genes12050666>

Academic Editor: Nico M. Van Straalen

Received: 25 March 2021

Accepted: 27 April 2021

Published: 29 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The peregrine falcon can be found on all continents except Antarctica. A decrease in the *Falco peregrinus* population in Europe occurred mainly in the 1950s and 1960s [1]. Wide use of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and other persistent chlorinated insecticides in agriculture led to the bioaccumulation of these chemicals. The accumulation of DDT and other persistent chlorinated insecticides resulted in ever thinner falcon eggshells [2], leading the peregrine falcon to the brink of extinction. In Europe, the only subspecies not to suffer from a significant reduction in its population size was *F. p. palei*. It is assumed that this was due to the different diet of this cliff-dwelling subspecies [3–5].

Despite the peregrine falcon's (*Falco p. peregrinus*) presence all over Poland, the population size has never been very large [6]. Following the population decrease in the 1950s, the last known nests of the species were observed in 1964 [7]. Between 1970 and 1985, only one breeding pair was recorded; this was in 1980 in the Tatra Mountains [8]. Poland's peregrine falcon population has mostly been of the tree-nesting ecotype (also called the "forest ecotype"). The range of the population of tree-nesting ecotype peregrine falcons is from northeast Germany through Poland and Belarus to central Russia (central and eastern Europe), and this ecotype became virtually extinct in the 1950s. Between 1950 and 2007, only one pair of tree-nesting peregrine falcons was reported [9,10]. Likewise, in Germany, there were no confirmed sightings of tree-nesting peregrine falcons until the mid-1990s [11]. The tree-nesting ecotype peregrine falcon belongs to the same subspecies (*Falco p. peregrinus*) as the urban ecotype. The ecotype of a falcon is determined by the

nesting site: falcons of the tree-nesting ecotype nest in trees, while birds of the urban ecotype prefer sites similar to cliffs or mountainside-like tops of skyscrapers or industrial chimneys. Despite the fact that the conditions conducive to tree nesting occur in places other than the above-mentioned fragment of Europe, there is no evidence of tree nesting in other areas. Furthermore, there is no evidence of phylogenetic differences between ecotypes [12,13]. Recent studies have shown that a mechanism of “imprinting” on the place of birth occurs, whereby birds that have hatched in tree nests, after leaving their parents’ nest, make nests in areas similar to those in which they were born [7].

The development of methods for breeding falcons in captivity in the 1960s made reintroduction programs possible [7]. In some countries of continental Europe and in the UK, reintroduction programs began in the 1970s with successful programs restoring the peregrine falcon population in some countries to pre-crisis numbers [2,14,15]. The breeding of peregrine falcons in Poland began around the late 1980s with the revival of Polish falconry. The birds in the newly established Polish breeding centers originated from West European breeding sources and represented the *Falco p. peregrinus* subspecies [7,12]. The reintroduction of peregrine falcons in Poland began in 1990, and in 1992, cooperation between breeding centers and institutions participating in their restoration commenced under the title “Program for the restitution of the peregrine falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) population in Poland.” [7]. The aim of this program was to establish a stable and functioning population of peregrine falcons across Poland. In the years 1990–1994, 51 young falcons were released [16]. By 2009, 345 peregrine falcons had been released into the wild, and in 2010, the program was taken over by the Society for Wild Animals “Falcon”, which is a non-governmental organization that is still responsible for peregrine falcon restitution in Poland today. Since 2010, a total of 879 individuals have been released into the wild, and the number of falcons bred in Poland has increased constantly [13].

Some peregrine falcon populations have been subjected to genetic variance analysis. Using samples from a Scandinavian population, Nesje et al. [17] described the genetic markers used for genetic variance analyses of peregrine falcons and other Falconidae members [17–20]. Nittinger et al. [18] used this panel of markers in addition to mitochondrial genotyping to describe the genetic structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the low genetic variance among this species. In Scandinavia, low genetic variance was found in a contemporary population as well as in a historical population from museal collections [19]. Bryndova et al. [1], analyzed wild and captive populations of peregrine and saker falcons living in the Czech Republic, and saker falcon significant differentiation between captive and wild birds was found. However, no significant differences were observed between peregrine falcons. Some peregrine falcon populations have been subjected to genetic variance analysis. The process of “gene flow” in dispersed populations shows that no continental subspecies is genetically isolated from another [20], but an analysis of two rural and two urban groups in a Polish population of European kestrels showed significant genetic differentiation between the analyzed groups [21].

2. Materials and Methods

2.1. Sampling and DNA Extraction

Peripheral blood was collected from wing veins by needle puncture, and this was inserted into test tubes containing 96% ethanol (Approval numbers 3181/2015 and 3445/2015). Blood samples and feathers were collected from 353 peregrine falcons, both captive ($n = 262$) and wild birds ($n = 91$) of the wild bird tree-nesting ecotype ($n = 34$) and urban nesting ($n = 57$) ecotype. Birds were assigned to ecotypes on the basis of observation of the place of nesting. The wild individuals originated from the Polish population and were collected from 19 nesting sites, 9 forest nests and 10 urban nests, as shown in Figure 1. The samples from captive birds were obtained from 47 breeders from 5 different countries—Poland ($n = 86$), Czech Republic ($n = 91$), Germany ($n = 54$), Slovakia ($n = 21$), and Denmark ($n = 10$)—prior to the birds being released into the wild as part of a restitution program. For

genetic variation analyses, individuals were divided into 6 groups, 5 containing captive birds divided by country of breeding and 1 containing wild birds.

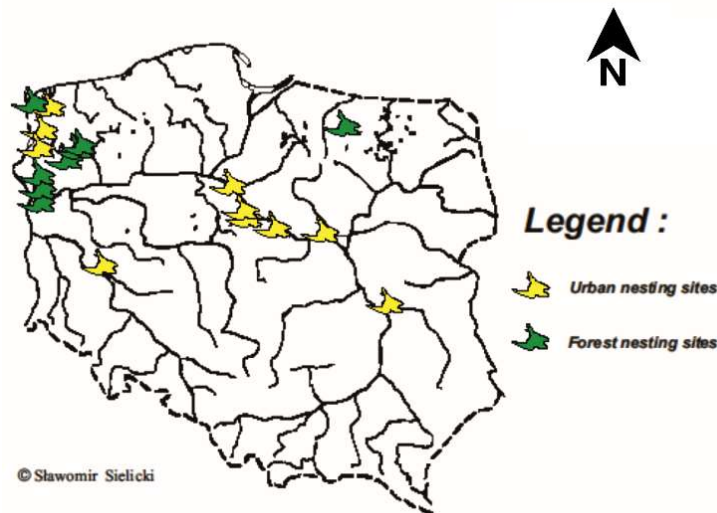


Figure 1. Map showing sampling locations from wild birds.

DNA was extracted from blood and feathers using the NucleoSpin Tissue mini kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. For DNA extraction from feathers, the duration of incubation with proteinase was extended to 12 h.

2.2. Microsatellite Genotyping

Microsatellite genotyping was performed for all individuals. Microsatellite markers were amplified with primers for *F. peregrinus* [1,17–19,22] (GenBank sequence accession numbers AF118420–AF118434 [17]). Based on the related body of literature, markers meeting the following criteria were selected for analysis: the possibility of performing the analysis through one Multiplex PCR reaction and the presence of a high locus polymorphism. The primer melting point and product length range were checked for all markers. The following markers were amplified with fluorescent primers that were labelled with 6-FAM, PET, VIC or NED: NVHfp5 (labelled with VIC), NVHfp13 (labelled with 6-FAM), NVHfp46_1 (labelled with VIC), NVHfp54 (labelled with PET), NVHfp79_4 (labelled with 6-FAM), NVHfp82_2 (labelled with VIC), NVHfp86_2 (labelled with PET), NVHfp89 (labelled with 6-FAM), NVHfp92 (labelled with NED), and NVMfp107 (labelled with NED). Multiplex PCR was performed in 7 μ L volume reactions, each reaction containing the following: 1 μ L of DNA (50–100 ng), 3.5 μ L of Master Mix, 0.35 μ L of Q-solution (Qiagen[®]), 0.93 μ L of H₂O, and primers in the following volumes (which were equal for reverse and forward primers and concentration of 100 pm/ μ L): NVHfp5, 0.056 μ L; NVHfp13, 0.056 μ L; NVHfp46_1, 0.05 μ L; NVHfp54, 0.070 μ L; NVHfp79_4, 0.056 μ L; NVHfp82_2, 0.042 μ L; NVHfp86_2, 0.105 μ L; NVHfp89, 0.056 μ L; NVHfp92, 0.056 μ L; NVHfp107, 0.042 μ L. The reaction was performed in a Biometra T3 thermocycler. The cycling conditions were as follows: 14.5 min at 95 °C; followed by 15 cycles at 95 °C for 30 s, 58 °C decreasing every cycle by 0.2 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and then 20 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and then 60 °C for 30 min. The samples were then kept 4 °C until collection.

PCR products were mixed with size standard and formamide loading buffer. An ABI3500 DNA analyzer was used to visualize the PCR products. Allele sizes were assigned using GENEMAPPER 4.0 software produced by Applied Biosystems Inc. GENEMAPPER 4.0 is a fragment analysis software for Applied Biosystems[®] genetic analyzers, which analyzes the quality of obtained fragments and assigns the analyzed fragments to specific

loci based on the length of the fragments and the type of dye. Lengths of obtained fragments represent specific alleles.

2.3. Statistical Analyses

Genotypes were tested for departure from the Hardy–Weinberg equilibrium using GenAlEx v6.5 software (Genetic Analysis in Excel) [23,24] by performing a Chi-Square Test of the Hardy–Weinberg Equilibrium. Testing was performed for samples from 5 countries in which independent breeding occurs and for all pooled samples.

The basic analysis, featuring genotype comparisons, heterozygosity calculation, and the estimation of allele numbers, was performed using GenAlEx and Excel 2016 v16.0.12901.20462 (Microsoft) software. The probability of the occurrence of null alleles was estimated using Cervus 3.0.7 [25].

The genetic distance among populations was calculated using Nei's [26] genetic distance method, which was performed with GenAlEx. A Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on Nei's genetic distance matrix was performed for data visualization in GenAlEx. The F-statistics for all analyzed samples and pairwise F-statistics were calculated with GenAlExPhylogenetic trees based on Nei's genetic distance matrix, which was constructed using the UPGMA [27] and the Neighbor-Joining method [28] using Mega X v10.2.4 [29].

In STRUCTURE v2.3.4 [30–33], the Bayesian clustering method was used. This method assumes the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) is present in the population and uses allele frequencies from multilocus genotype data and Markov chain Monte Carlo (MCMC) sampling to assign individuals to a given number of clusters (K) [32]. Analyses were performed for K in the range 1–15 in 3 repetitions for each value of K. The Length of Burn-in Period was set to 50,000, and the Number of MCMC Reps after Burn-in was set to 500,000. Next, the results from STRUCTURE v2.3.4 were analyzed in the STRUCTURE Harvester v0.6.94 [34] program, which processes the results from STRUCTURE and executes the “Evanno” method [35]. Evanno plots from the STRUCTURE Harvester enable one to detect the number of K groups that best fits the data [34].

3. Result

Multilocus genotypes were obtained in 10 loci. A total of 326 out of 353 individuals were genotyped in all loci, 23 in 9 loci and 4 in 8 loci. No null alleles were found. Every individual had a unique multilocus genotype. The number of alleles per locus in the analyzed groups ranged from 2 to 9. The mean heterozygosity observed for each country of breeding and the wild population ranged from 28.9% to 41.2%, with an average value of 35.1%. Private alleles were observed in five samples across four populations in five different loci. The marker NVHfp5 was found to be monomorphic in the Danish population.

Genetic variability factors across all samples are presented in Table 1. The pairwise F_{ST} varied from 0.008 (for the Poland captive–Czech Republic pair) to 0.081 (for the Poland wild–Denmark pair) with an average value of 0.035. The highest F_{ST} values were obtained for pairs containing Denmark (mean value 0.063). For each of these pairs, the calculated F_{ST} was greater than for any other pair (the mean when pairs containing Denmark were excluded was equal to 0.021). This may have been caused by the low number of individuals from Denmark included ($n = 10$). In addition, one of these individuals was properly genotyped in nine loci, while the genotype with the NVHfp92_1 locus was not obtained.

Nei's genetic distance varied from 0.018 (for the Poland captive–Czech Republic pair) to 0.207 (for the Poland wild–Denmark pair) with an average value of 0.082. Similar to F_{ST} , highest Nei's genetic distance values were obtained for pairs containing Denmark (mean value 0.152). Figure 2 shows the results of the PCoA analysis of Nei's genetic distance. In the chart, axis 1 explains 87.32% of the variation and axis 2 explains 7.42% of the variation present. The cumulative percentage of variation explained by Figure 2 is equal to 94.74%.

Table 1. Analysis of genetic variability.

Locus	Allele Ranges	<i>n</i>	Na	Ne	Ho	He	F _{ST}
NVHfp107	114–208	350	6	1.950	0.454	0.487	0.042
NVHfp13	93–103	350	9	4.714	0.554	0.788	0.030
NVHfp46_1	117–122	350	6	2.925	0.540	0.658	0.055
NVHfp5	104–108	352	3	1.489	0.057	0.328	0.159
NVHfp54	104–116	348	7	2.395	0.382	0.528	0.049
NVHfp79_4	104–142	352	3	1.982	0.000	0.495	0.029
NVHfp82_2	134–140	352	4	1.143	0.085	0.125	0.060
NVHfp86_2	140–145	343	5	2.146	0.370	0.534	0.045
NVHfp89	116–132	347	9	4.467	0.617	0.776	0.052
NVHfp92_1	110–130	349	9	2.617	0.298	0.618	0.075

n—number of scored individuals, Na—observed number of alleles, Ne—effective number of alleles, Ho—observed heterozygosity, He—expected heterozygosity, F_{ST}—F-statistic.

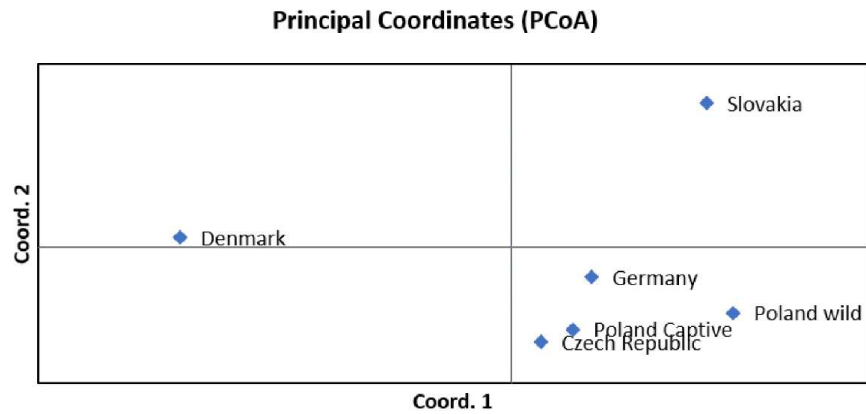


Figure 2. Principal Coordinates Analysis (PCoA) plot showing the genetic distance between groups.

The best fit for the data determined by analyzing the STRUCTURE results with the “Evanno” method obtained for K = 2 groups (Figure 3). As Figure 4 shows, there were individuals belonging to both groups estimated by the program. It seems that the country of breeding did not affect group assignment. One bird from the Czech Republic was not assigned to a group due to its genetic similarity to both groups (~50% for both groups).

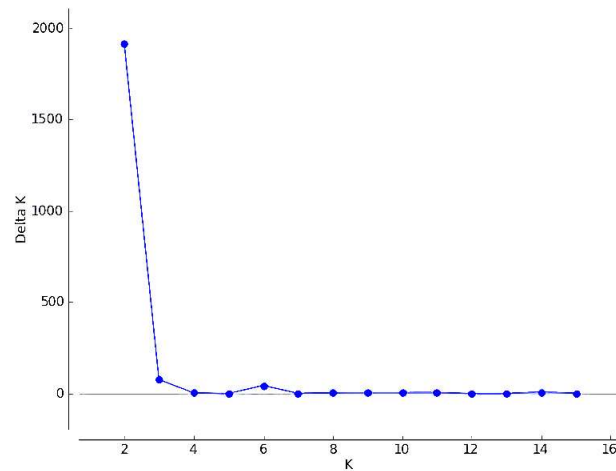


Figure 3. Delta K plot showing the value of K (number of groups within a population) that best fits the genetic data.

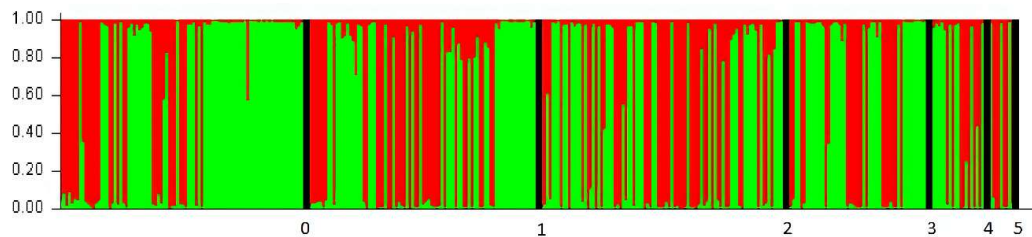


Figure 4. “STRUCTURE” plot that shows the genetic affiliation to groups computed by the program. Each column represents one individual and each color represents percentage of affiliation of individual to one genetic group estimated by program, green—group 1, red—group 2. Individuals are ordered by origin: 0—Poland wild, 1—Poland captive, 2—Czech Republic, 3—Germany, 4—Slovakia, 5—Denmark.

The genetic distance tree (Figure 5) containing birds from different breeding places in Europe shows trends in the exchange of birds between breeders and is consistent with the pedigree documentation.

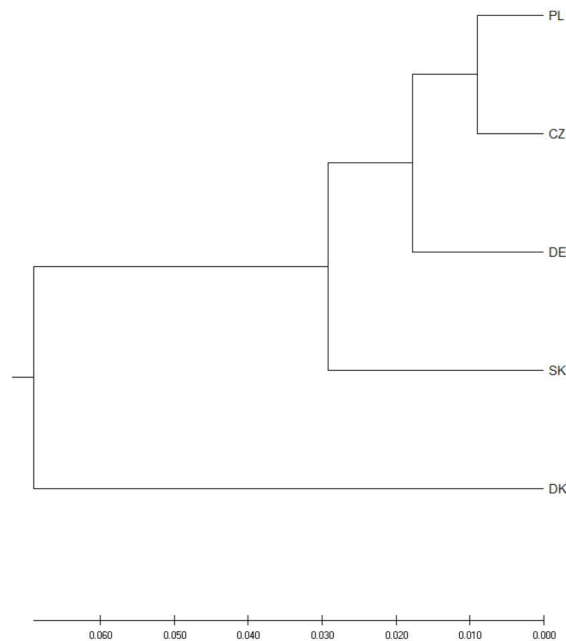


Figure 5. Nei's distance relationships among breeding groups. The distances were inferred using the UPGMA method. The optimal tree with a sum of branch length of 0.19396867 is shown. The tree is drawn to scale with branch lengths having the same units as those of the Nei's distances used to infer the distance matrix. PL—Poland, CZ—Czech Republic, DE—Germany, SK—Slovakia, DK—Denmark.

When only wild birds divided by ecotype (urban or tree-nesting) were analyzed, according to the STRUCTURE Harvester, the variability in the population was best described by division into two groups (delta K = 383.190615). Forty out of 57 urban ecotype individuals were classified into group 1, while 23 out of 34 tree-nesting individuals were classified into group 2 (Figure 6).

The division into two groups is even more visible on the genetic distance tree (Figure 7). The similarity of birds within a given ecotype varied, but in general, it can be seen that birds belonging to the urban ecotype differed from individuals belonging to the forest ecotype.

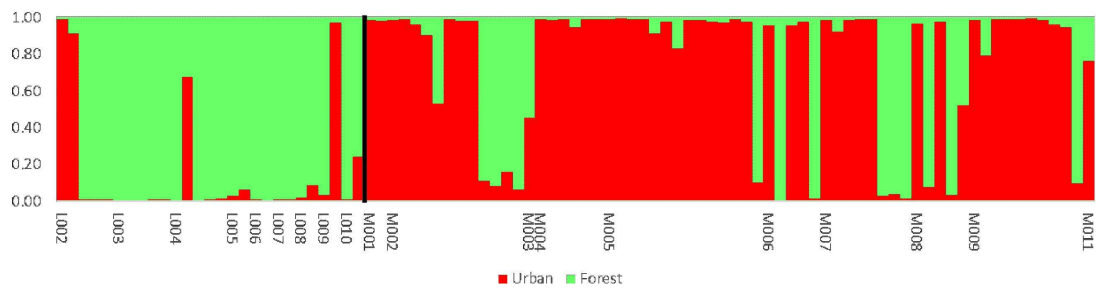


Figure 6. “STRUCTURE” plot that shows genetic affiliation to groups computed by the program. Each column represents one individual and each color represents one genetic group. Individuals were ordered by ecotype and nest: U—Urban nest, L—Forest nest, the numbers shown the different nests.

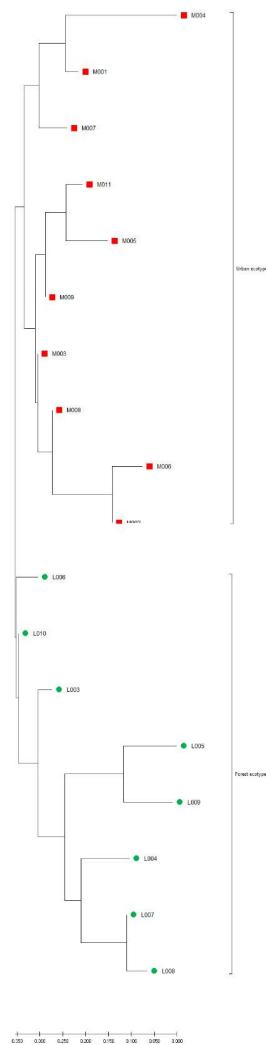


Figure 7. Nei’s distance relationships among nests and ecotypes. The distance was inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with a sum of branch length of 157,714,544 is shown. The tree is drawn to scale with branch lengths having the same units as those of the Nei’s distances used to infer the distance matrix. U—Urban nest, L—Forest nest; the numbers shown the different nests.

4. Discussions

4.1. Population Variability

Compared to the Scandinavian population of peregrine falcons that was studied by Nesje et al. [17], who analyzed 24 unrelated individuals and 64 dyads of full-siblings and potential full-siblings, 9 out of 10 markers had a greater number of alleles, and in the case of marker NVHfp79_4, the number of alleles was equal in both studies. For 8 out of 10 markers observed, heterozygosity was greater in the Scandinavian population.

In another study, three groups of Scandinavian birds were analyzed [19]: historical ($n = 38$), captive ($n = 20$), and contemporary ($n = 44$) wild populations. Compared to the historical populations originating from Denmark and Norway, for 6 out of 10 markers, the number of alleles was greater in our study, and for two markers, the number of alleles was lower. The observed heterozygosity was greater in the historical Scandinavian population for seven markers. Compared with captive and contemporary populations, the number of alleles in our population was greater for seven markers in both these comparisons. The observed heterozygosity was lower for seven markers; however, only one marker had a greater observed heterozygosity in both captive and contemporary populations.

Similarly, as with the Czech falcon population [1], the Polish wild population was not found to differ visibly from the breeding one. Individuals from both Polish populations were classified into both populations estimated in STRUCTURE. The reason for this can be found in the Polish reintroduction plan, which is based on individuals originating from all breeding centers included in our analysis and on cooperation between European breeders, resulting in a flow of birds between breeding centers [7].

The microsatellite analysis revealed a low level of genetic variation in the Fiji falcon population associated with a lack of gene flow from populations inhabiting the nearest islands and leading to differences among the analyzed populations [36]. Microsatellites are proving to be capable of distinguishing between populations. In our study, gene flow between the analyzed populations was confirmed in the cases of both breeder-breeder and breeder-environment flow. It is also likely that gene flow will appear between populations living in neighboring countries, such as between Germany and the Czech Republic or the Polish population. However, such a flow may prove to be difficult to detect due to the use of birds originating from breeding centers that also provide birds for the Polish reintroduction program in these countries. Further analyses using more genetic markers and data from ornithological rings are needed.

A low level of heterozygosity was observed across all analyzed samples in loci NVHfp82_2, NVHfp79_4 and NVHfp5 (Table 1) in our study. Despite the low level of genetic variation among previously analyzed peregrine falcon populations shown in other studies [1,17,19], the level of heterozygosity in the discussed loci was greater in all other populations, excepted for the Fijian population, although Fijian population was monomorphic [36]. In further studies, the rejection of these markers should be carefully considered. The majority of the studied group of birds (262 individuals) were captive breeding animals. The proximity of breeding centers and the exchange of birds may reduce the heterozygosity of species whose genetic variation shows a poor population structure (i.e., differentiation) consistent with incomplete sorting among rapidly evolving lineages [37].

4.2. Bird Release Point

The main aim of the Polish reintroduction program has been to restore the tree-nesting population. Our wild population analysis shows genetic differences between ecotypes. The genetic distance tree shows individuals representing both ecotypes. Their diversity is mainly due to isolation—birds from the urban ecotype do not migrate to forests. However, the reintroduction process may change this relationship. Birds introduced in urban areas show greater diversity than tree nesting birds. However, no correlation between the genetic distance and the distance of the studied nests was found, which clearly indicates that in most cases there is no natural gene flow. An analysis performed on the Polish population of the Eurasian coot (*Fulica atra*) showed that long-established

urban populations differ significantly from the forest population, although no significant differences between newly established urban populations and the forest population were identified [38]. The differences between the studied populations of wild falcons may become blurred as a result of their ongoing reintroduction.

4.3. Stock of Falcons for Reintroduction

Due to the lack of wild falcons, breeding materials for Polish falcon breeding centers were brought from Western European breeding sources [16]. In the STRUCTURE analysis, individuals were classified into two groups independently of the country of origin when wild birds were included. When wild birds were excluded, individuals were classified into two groups, and in both cases, classification seemed to be independent from the country of breeding. European breeders cooperate with each other [7]. Bird exchange between breeders explains why we were only able to distinguish between two genetic groups of captive falcons (despite the fact that the analyzed individuals came from 47 breeding sites located in five countries).

4.4. Implications for Conservation

Genetic monitoring of populations can lead to improved population management (see [39]). Some data suggest that decades of breeding in captivity has had an impact on the falcon genome due to the creation of selection regimes, even though this was probably not a deliberate act [40]. Selective breeding to obtain certain traits (such as size or pursuit patterns) desired by falconers is likely to have had an impact on the falcon genome; moreover, captive falcons have sometimes been hybridized [41]. It is crucial to monitor captive individuals to be used for reintroduction as well as the wild population. Our analysis may be the first step toward improving the management of the Polish population of peregrine falcons. Estimation of the population's genetic variability and number of groups provides insight into the effects of a reintroduction plan as well as basic knowledge that enables the use of more powerful (and expensive) genetic tools such as DNA sequencing or microarray analyses. Equipped with this knowledge, study groups can be optimally designed for these analyses. We are cooperating with the Society for Wild Animals "Falcon", which is a non-governmental organization that has been responsible for peregrine falcon restitution in Poland since 2010. On the one hand, this provides wide access to biological samples, and on the other, it provides the opportunity to apply the results of our population studies.

Author Contributions: Conceptualization, S.S. and Z.N.-Ż.; methodology, Z.N.-Ż. and K.O.P.; software, K.O.P.; validation, K.O.P., Z.N.-Ż. and S.S.; formal analysis, K.O.P.; investigation, Z.N.-Ż. and K.O.P.; resources, S.S.; data curation, K.O.P. and S.S.; writing—original draft preparation, K.O.P.; writing—review and editing, Z.N.-Ż.; visualization, K.O.P.; supervision, W.O.; project administration, S.S. and Z.N.-Ż.; funding acquisition, S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Operational Program Infrastructure and Environment under grant number POIS.02.04.00-00-0127/16-00. "The APC was funded by the Operational Program Infrastructure and Environment "Restytucja sokoła wędrownego w Polsce" (Nr POIS.02.04.00-00-0127/16-00) w ramach działania 2.4.1/1/2016 oś priorytetowa II Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko 2014–2020 Konkurs 2.4.1/1/2016)".

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Polish Laboratory Animal Science Association 3181/2015 and 3445/2015.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Bryndová, M.; Putnová, L.; Bartoňová, P.; Kaplanová, K.; Urban, T. Genetic differences between wild and captive populations of the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and the saker falcon (*Falco cherrung*) living in the Czech Republic. *J. Agric. Sci. Technol. B* **2012**, *2*, 642–651.
2. Wegner, P.; Kleinstäuber, G.; Baum, F.; Schilling, F. Long-term investigation of the degree of exposure of German peregrine falcons (*Falco peregrinus*) to damaging chemicals from the environment. *J. Ornithol.* **2005**, *146*, 34–54. [[CrossRef](#)]
3. Brown, J.W.; Van Coeverden De Groot, P.J.; Birt, T.P.; Seutin, G.; Boag, P.T.; Friesen, V.L. Appraisal of the consequences of the DDT-induced bottleneck on the level and geographic distribution of neutral genetic variation in Canadian peregrine falcons, *Falco peregrinus*. *Mol. Ecol.* **2007**, *16*, 327–343. [[CrossRef](#)]
4. Crick, H.Q.P.; Ratcliffe, D.A. The peregrine *Falco peregrinus* breeding population of the United Kingdom in 1991. *Bird Study* **1995**, *42*, 1–19. [[CrossRef](#)]
5. Olsen, P.; Emison, B.; Mooney, N.; Brothers, N. DDT and dieldrin: Effects on resident peregrine falcon populations in south-eastern Australia. *Ecotoxicology* **1992**, *1*, 89–100. [[CrossRef](#)]
6. Mizera, T.; Sielicki, J. The peregrine falcon *Falco peregrinus* in Poland—Its situation and perspectives for reinstatement. *Acta Ornithol.* **1995**, *30*, 47–52.
7. Sielicki, S.; Sielicki, J. Restoration of peregrine falcon in Poland 1989–2007. In *Peregrine Falcon Populations—Status and Perspectives in 21st Century*, 1st ed.; Sielicki, J., Mizera, B., Eds.; Turul publishing and Poznań University of Life Sciences Press: Warsaw-Poznań, Poland, 2009; Volume 1, pp. 699–722.
8. Cichocki, W. Some species of breeding birds in Tatra National Park. *Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody* **1986**, *7*, 57–62. (In Polish)
9. Ivanovsky, V.; Vintchevski, A. Status of the peregrine falcon in Belarus. In *Peregrine Falcon Populations—Status and Perspectives in 21st Century*, 1st ed.; Sielicki, J., Mizera, B., Eds.; Turul publishing and Poznań University of Life Sciences Press: Warsaw-Poznań, Poland, 2009; Volume 1, pp. 117–120.
10. Brambilla, M.; Rubolini, D.; Guidali, F. Factors affecting breeding habitat selection in a cliff-nesting peregrine *Falco peregrinus* population. *J. Ornithol.* **2006**, *147*, 428–435. [[CrossRef](#)]
11. Kirmse, W. Tree-nesting Peregrines *Falco p. peregrinus* in Europe did not recover. In *Raptors Worldwide*, 1st ed.; Chancellor, R.D., Meyburg, B.U., Eds.; WWGBP: Berlin, Germany, 2004; Volume 1, pp. 271–277.
12. Sielicki, S.; Sielicki, J. Falconry and the restoration of the peregrine falcon in Poland in 1990–2015. In *Falconry—Its Influence on Biodiversity and Cultural Heritage*, 1st ed.; Szymak, U., Sianko, P., Eds.; Muzeum Podlaskie w Białymstoku: Białystok, Poland, 2016; Volume 1, pp. 41–47.
13. Ławicki, L.; Sielicki, S. Restoration of the tree-nesting population of the peregrine falcon *Falco peregrinus* in Pomerania. *Ornis Pol.* **2019**, *60*, 75–84.
14. Banks, A.N.; Crick, H.Q.P.; Coombes, R.; Benn, S.; Ratcliffe, D.A.; Humphreys, E.M. The breeding status of peregrine falcons *Falco peregrinus* in the UK and Isle of Man in 2002. *Bird Study* **2010**, *57*. [[CrossRef](#)]
15. Verdejo, J.; López-López, P. Long-term monitoring of a peregrine falcon population: Size, breeding performance and nest-site characteristics. *Ardeola* **2008**, *55*, 87–96.
16. Wisniewski, G. Programme for the reinstatement of the peregrine falcon *Falco peregrinus* in Poland. *Acta Ornithol.* **1995**, *30*, 73–78.
17. Nesje, M.; Røed, K.H.; Bell, D.A.; Lindberg, P.; Lifjeld, J.T. Microsatellite analysis of population structure and genetic variability in peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Anim. Conserv.* **2000**, *3*, 267–275. [[CrossRef](#)]
18. Nittinger, F.; Gamauf, A.; Pinsker, W.; Wink, M.; Haring, E. Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: Mitochondrial and microsatellite data. *Mol. Ecol.* **2007**, *16*, 1497–1517. [[CrossRef](#)]
19. Jacobsen, F.; Nesje, M.; Bachmann, L.; Lifjeld, J.T. Significant genetic admixture after reintroduction of peregrine falcon (*Falco peregrinus*) in Southern Scandinavia. *Conserv. Genet.* **2008**, *9*, 581–591. [[CrossRef](#)]
20. Bell, D.A.; Griffiths, C.S.; Caballero, I.C.; Hartley, R.R.; Lawson, R.H. Genetic Evidence for Global Dispersal in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and Affinity with the taita falcon (*Falco fasciinucha*). *J. Raptor Res.* **2014**, *48*, 44–53. [[CrossRef](#)]
21. Rutkowski, R.; Rejt, L.; Tereba, A.; Gryczyńska-Siemiakowska, A.; Janic, B. Population genetic structure of the European kestrel *Falco tinnunculus* in Central Poland. *Eur. J. Wildl. Res.* **2010**, *56*, 297–305. [[CrossRef](#)]
22. Groombridge, J.J.; Dawson, D.A.; Burke, T.; Prys-Jones, R.; Brooke, M.; de L. Brooke, M.; Shah, N. Evaluating the demographic history of the Seychelles kestrel (*Falco araea*): Genetic evidence for recovery from a population bottleneck following minimal conservation management. *Biol. Conserv.* **2009**, *142*, 2250–2257. [[CrossRef](#)]
23. Peakall, R.; Smouse, P.E. GenA1Ex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **2006**, *6*, 288–295. [[CrossRef](#)]
24. Peakall, R.; Smouse, P.E. GenA1Ex 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2537–2539. [[CrossRef](#)]
25. Marshall, T.C.; Slate, J.; Kruuk, L.; Pemberton, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* **1998**, *7*, 639–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **1978**, *89*, 583–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. *Numerical Taxonomy*; Freeman: San Francisco, CA, USA, 1973.
28. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425. [[PubMed](#)]
29. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
30. Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes* **2007**, *7*, 574–578. [[CrossRef](#)]
31. Hubisz, M.J.; Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resour.* **2009**, *9*, 1322–1332. [[CrossRef](#)]
32. Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **2000**, *155*, 945–959. [[CrossRef](#)]
33. Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* **2003**, *164*, 1567–1587. [[CrossRef](#)]
34. Earl, D.A.; vonHoldt, B.M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* **2012**, *4*, 359–361. [[CrossRef](#)]
35. Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* **2005**, *14*, 2611–2620. [[CrossRef](#)]
36. Talbot, S.L.; Palmer, A.G.; Sage, G.K.; Sonsthagen, S.A.; Swem, T.; Brimm, D.J.; White, C.M. Lack of genetic polymorphism among peregrine falcons *Falco peregrinus* of Fiji. *J. Avian Biol.* **2011**, *42*, 415–428. [[CrossRef](#)]
37. White, C.M.; Cade, T.J.; Enderson, J.H. *Peregrine Falcons of the World*; Lynx Edicions: Barcelona, Spain, 2013.
38. Minias, P.; Włodarczyk, R.; Minias, A.; Dziadek, J. How birds colonize cities: Genetic evidence from a common waterbird, the Eurasian coot. *J. Avian Biol.* **2017**, *48*, 1095–1103. [[CrossRef](#)]
39. Johnson, J.A.; Talbot, S.L.; Sage, G.K.; Burnham, K.K.; Brown, J.W.; Maechtle, T.L.; Seegar, W.S.; Yates, M.A.; Anderson, B.; Mindell, D.P. The use of genetics for the management of a recovering population: Temporal assessment of migratory peregrine falcons in North America. *PLoS ONE* **2010**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wilcox, J.J.S.; Boissinot, S.; Idaghdour, Y. Falcon genomics in the context of conservation, speciation, and human culture. *Ecol. Evol.* **2019**, *9*, 14523–14537. [[CrossRef](#)]
41. Fleming, L.V.; Douse, A.F.; Williams, N.P. Captive breeding of peregrine and other falcons in Great Britain and implications for conservation of wild populations. *Endanger. Species Res.* **2011**, *14*, 243–257. [[CrossRef](#)]

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. [data]

Karol Puchała

Górczewska 228/19 01-460 Warszawa

669544520

Karol.puchala2@gmail.com

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2022, Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population, Genes, 13, 1487 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na, opracowaniu metodologii, doborze oprogramowania, walidacji danych, analizie danych, napisaniu manuskryptu oraz wizualizacji danych, co stanowi 81% pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 21.08.2023 r

Zuzanna Nowak-Życzyńska

Marco Polo 1 m 40;

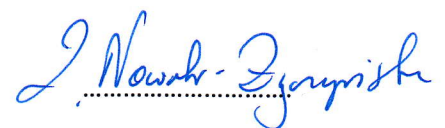
02-776 Warszawa

zuza.zyczynska@gmail.com

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2022, Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population, Genes, 13, 1487 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na konceptualizacji, opracowaniu metodologii, walidacji danych, o cenie i edycji manuskryptu, administracji w projekcie, co stanowi 8% pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

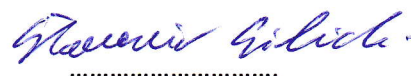
Warszawa, dn. 25-08-2023 r.

Sławomir Sielicki
ul. Sokolników 15
87-880 Brześć Kujawski
tel. 608 36 56 46
email: falco@peregrinus.pl

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Puchala K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2022, Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population, Genes, 13, 1487 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu środków oraz materiału badawczego, zarządzaniu danymi, konceptualizacji, walidacji danych, co stanowi 8 % pracy.



.....
Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 28.09.2023

Wanda Olech

Kopcińskiego 5 m 8, Warszawa

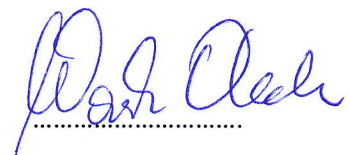
605095501

Wanda_olech@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Puchała K.O., Nowak-Życzyńska Z., Sielicki S., Olech W., 2022, Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population, Genes, 13, 1487 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym, co stanowi 3 % pracy.



Podpis

Article

Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population

Karol O. Puchała ¹ , Zuzanna Nowak-Życzyńska ^{1,*}, Sławomir Sielicki ² and Wanda Olech ¹ 

¹ Department of Animal Genetics and Conservation, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warszawa, Poland

² Society for Wild Animals "Falcon", 87-800 Włocławek, Poland

* Correspondence: zuza.zyczynska@gmail.com

Abstract: The main objective of this study was to determine the impact of increased demand for peregrine falcons via breeding (mainly Polish, Czech, German and Slovak) on the genetic structure of the birds. In the analysis, 374 specimens from six countries were sampled in 2008–2019 (omitting 2009), and all the birds analyzed were released into the wild as part of the Polish reintroduction program. The assessment of genetic variation was based on a well-known panel of 10 microsatellite markers described for the species. We calculated a fixation index for the samples from each year, and based on this, we determined the level of inbreeding. We also performed an analysis using the Bayesian cluster method, assuming that 1–19 hypothetical populations would define the division that best fit the samples. The most probable division was into two groups; in the first group, the samples from individuals delivered in 2013 were most often segregated; moreover, in this year, a jump in inbreeding, expressed by the fixation index, was observed.

Keywords: microsatellites; populational genetics; *Falco peregrinus*



Citation: Puchała, K.O.; Nowak-Życzyńska, Z.; Sielicki, S.; Olech, W. Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population. *Genes* **2022**, *13*, 1487. <https://doi.org/10.3390/genes13081487>

Academic Editors: Martino Cassandro and Tomasz Szwaczkowski

Received: 19 July 2022

Accepted: 17 August 2022

Published: 20 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The earliest evidence of falconry activity dates to around 5000 B.C. and comes from Tell Chuera, an archaeological site in northeastern Syria [1]. However, methods for breeding peregrine falcons in captivity were developed in the 1960s [2]. In Europe, there was a sharp decline in peregrine falcon populations in the 1950s and 1960s [3] caused largely by the widespread use of chlorinated hydrocarbon insecticides, mainly DDT (dichlorodiphenyl-trichloroethane), in agriculture. The accumulation of these compounds led to the rubbing of falcon egg shells, resulting in eggs being crushed during hatching. This brought the species to the brink of extinction [4].

Reintroduction of the peregrine falcon was possible, thanks to intensive breeding efforts [2]. Reintroduction is the release of representatives of the species into the environment, in areas that the species occupied in the past and where it became extinct. It assumes the establishment of a stable, self-sustaining population. Reintroduction programs have relatively low success rates [5]. However, using individuals from captivity, it has been possible to re-establish falcon populations in Sweden [6], France [7], Germany [8], the US [9] and the UK [10]. The reintroduction of specimens obtained from breeding is also used for other birds of prey, e.g., in efforts to restore the population of the common redshank (*Falco cherrug*) in Bulgaria [11].

In Poland, peregrine falcon reintroduction has been taking place since 1990 and focuses on restoring the tree-nesting ecotype population, with individuals from breeders located in Poland and Western European countries [2,12]. In 2010, the reintroduction program was taken over by the Falcon Wildlife Association, at which time the number of released birds increased significantly. Over the 2010–2015 period alone, 546 individuals were reintroduced, 201 more than over the 1990–2009 period when a total of 345 individuals were reintroduced.

Between 2008 and 2019 (when our samples were collected), the following numbers of individuals were released into the environment: 2008: 23, 2009: 3, 2010: 56, 2011: 66, 2012: 75, 2013: 142, 2014: 129, 2015: 76, 2016: 38, 2017: 52, 2018: 78 and 2019: 55. Historically, the Polish population of peregrine falcons consisted mainly of representatives of the tree-nesting ecotype which occurred only in central and eastern Europe from northeastern Germany to central Russia [13,14]. The ecotype of falcons is defined from the nesting site; individuals of the tree-nesting ecotype nest in trees, while individuals of the urban ecotype nest on cliffs or mountain slopes and infrastructure elements resembling them (e.g., the tops of industrial chimneys). The influence of so-called “imprinting” is noted here, whereby birds, after leaving their parents’ nests, tend to nest in areas similar to those in which they were born. This mechanism perpetuates the division into ecotypes. It is also the reason that the restoration of the urban ecotype has not resulted in the natural restoration of the tree-nesting population [2]. The maintenance of two ecotypes inhabiting different environments can be very beneficial in terms of the conservation of the species. Both ecotypes belong to the same subspecies, *Falco peregrinus peregrinus* [12,15].

Nesje et al. [16] described a panel of genetic markers used for genetic variation analysis in peregrines and other falcons. These markers have been successfully used by other researchers, to describe among others, the genetic structure of the peregrine falcon [17], the Scandinavian peregrine population [18], wild and breeding populations of peregrine falcons and peregrines in the Czech Republic [3], and the Finnish peregrine population [19].

The aim of this study was to assess how the genetic structure of individuals used in reintroduction efforts has changed over the years 2008–2019.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling and DNA Extraction

Peripheral blood was collected from wing veins via needle puncture, and then, stored in 96% ethanol (approval numbers 3181/2015 and 3445/2015). Blood samples were collected from 374 captive peregrine falcons. The samples were obtained from 47 breeders from 6 different countries—Poland ($n = 127$), the Czech Republic ($n = 117$), Germany ($n = 79$), Slovakia ($n = 38$), Denmark ($n = 10$) and the Netherlands ($n = 3$)—prior to the birds being released into the wild as part of a Polish restitution program. Samples were obtained during the years: 2008 ($n = 11$), 2010 ($n = 46$), 2011 ($n = 53$), 2012 ($n = 73$), 2013 ($n = 65$), 2014 ($n = 43$), 2015 ($n = 35$), 2016 ($n = 6$), 2017 ($n = 16$), 2018 ($n = 18$) and 2019 ($n = 8$). All individuals, divided by country, were used for the first part of the analysis; then, 170 individuals from the 6 breeders that provided the most falcons for reintroduction were analyzed. Of these breeders, 1 was from Germany (breeder 1), 1 was from Slovakia (breeder 3), 2 were from the Czech Republic (breeder 2 and breeder 5) and 2 were from Poland (breeder 4 and breeder 6).

DNA was extracted from blood using the NucleoSpin Tissue mini kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) in accordance with the manufacturer’s instructions.

2.2. Microsatellite Genotyping

Microsatellite genotyping was performed for all samples using 10 markers for which primers have been described in the literature for *Falco peregrinus* species [4,16–18] (GenBank sequence accession numbers AF118420–AF118434 [16]).

Based on the related literature, 10 markers were selected: NVHfp5 (labeled with VIC), NVHfp13 (labeled with 6-FAM), NVHfp46_1 (labeled with VIC), NVHfp54 (labeled with PET), NVHfp79_4 (labeled with 6-FAM), NVHfp82_2 (labeled with VIC), NVHfp86_2 (labeled with PET), NVHfp89 (labeled with 6-FAM), NVHfp92 (labeled with NED) and NVMfp107 (labeled with NED). These markers were characterized by the presence of high locus polymorphism, primer melting points and product length, which allowed the reactions to be carried out as one multiplex PCR (polymerase chain reaction) procedure. Reactions were performed as described by Puchała et al. [20]. Marker NVHfp79-4 was excluded from analysis due to null heterozygosity and low variability.

Visualization of the PCR product was performed using an ABI3500 DNA analyzer. For this purpose, the reaction product was mixed with formamide loading and size standard.

Allele sizes were assigned using GENEMAPPER 4.0 software, produced by Applied Biosystems Inc.

2.3. Statistical Analyses

Using GenAlEx v6.5 (Genetic Analysis in Excel) [21,22] software, genotypes were tested for departure from the Hardy–Weinberg equilibrium. All samples were pooled. Using GenAlEx and Excel (Microsoft) software, genotype comparisons, heterozygosity calculation and the estimation of allele numbers were performed. The probability of the occurrence of null alleles was estimated using Cervus 3.0.7 [23].

Relatedness and inbreeding analyses were performed using GenAlEx, and the fixation index for all analyzed samples and for groups which were analyzed in the second stage of the analysis were calculated. Data were visualized using Excel.

The genetic distance between the populations of the 6 largest breeders was estimated using Nei’s method [24]. This method allows for the calculation of genetic distance based on allele frequencies and is implemented in GenAlEx. Phylogenetic trees were then constructed using the Neighbor-Joining method [25] in Mega X [26].

Simulation of the most probable division of individuals into groups was performed using STRUCTURE v2.3.4 [27–30] and STRUCTURE Harvester v0.6.94 [31]. First the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE software was used. This method uses allele frequencies calculated from multilocus genotypes and Monte Carlo Markov Chain (MCMC) sampling to assign individuals to given number of clusters (K). The assumption of the method is that there is the Hardy–Weinberg equilibrium in the given population [27]. Analyses were performed for K within the range of 1–19 in 3 repetitions for each value of K. The length of the burn-in period was set to 50,000, and the Number of MCMC Reps after burn-in was set to 500,000. Then, using STRUCTURE HARVESTER, the “Evanno” method was applied to the output from STRUCTURE. Evanno plots enable one to detect the number of K groups that best fits the data [32]. Specimens were separated by year for analysis in the structure program, then separate analyses were performed for specimens from a single breeder.

3. Results

3.1. All Samples

Multilocus genotypes were obtained in 10 loci. A total of 347 out of 374 individuals were genotyped in all loci, with 25 in nine loci and 2 in eight loci. Among the individuals genotyped at all loci, 85 had a unique genotype. No null alleles were found. The number of alleles observed at the loci ranged from four to nine. In one population, the private allele was present in the genotypes of 4 out of 38 individuals originating from Slovakia. The fixation index among all samples was 0.409. The genetic variability parameters across all the samples are presented in Table 1.

Table 1. Analysis of genetic variability for all samples.

Locus	Allele Ranges	N	Na	Ne	Ho	He	F
NVHfp107	203–208	373	4	2.082	0.466	0.520	0.102
NVHfp13	93–103	373	9	4.654	0.488	0.785	0.379
NVHfp46_1	117–122	373	6	4.129	0.539	0.758	0.289
NVHfp5	102–108	374	5	1.462	0.070	0.316	0.780
NVHfp54	104–208	369	9	2.487	0.428	0.598	0.284
NVHfp82_2	134–140	373	5	1.648	0.137	0.393	0.652
NVHfp86_2	140–145	368	5	3.453	0.351	0.710	0.507
NVHfp89	116–132	367	9	4.831	0.569	0.793	0.282
NVHfp92_1	110–126	365	7	3.011	0.288	0.668	0.569

N—number of scored individuals, Na—observed number of alleles, Ne—effective number of alleles, Ho—observed heterozygosity, He—expected heterozygosity, F—fixation index.

For groups divided by year of collection, Nei's genetic distance varied from 0.009 (for the 2010–2011 pair) to 0.830 (for the 2008–2018 pair) with an average value of 0.280.

STRUCTURE analysis was performed for all the samples, divided by years. As presented in Figure 1, the most likely number of groups is $K = 2$. The "STRUCTURE" plot (Figure 2a) shows the change in the genetic structure of the birds between 2013 and 2014. Birds released after 2015 were mostly assigned to group 2 by the algorithm.

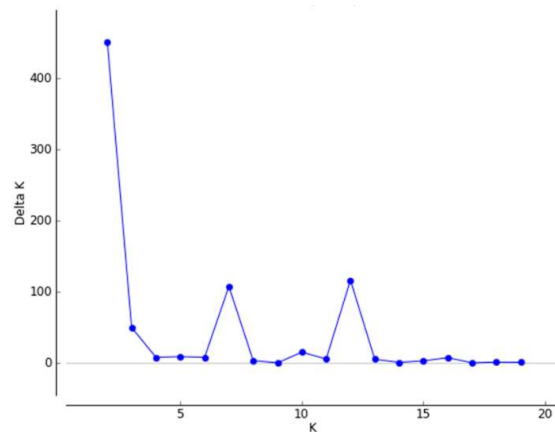


Figure 1. DeltaK plot showing the value of K (number of groups within population) that best fits the data.

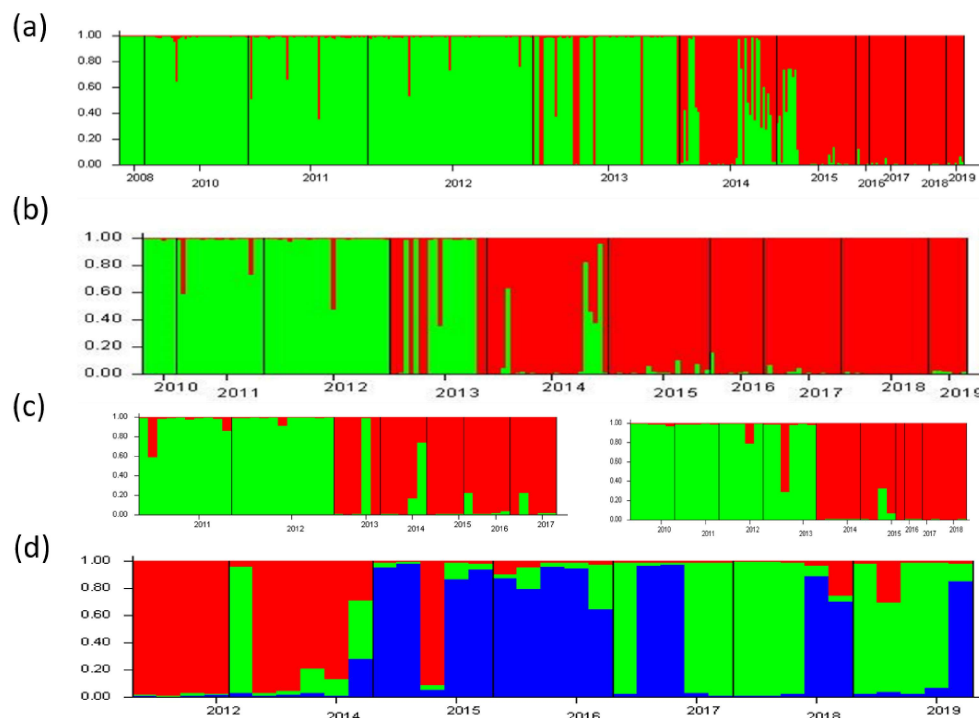


Figure 2. "STRUCTURE" plot that shows the genetic affiliation to groups computed by the program. Each column represents one individual and each color represents one genetic group. Individuals were divided by year of sampling. (a) All 374 individuals, $K = 2$; (b) 170 individuals from 6 main breeders, $K = 2$; (c) 45 individuals from breeder 1 and 38 individuals from breeder 3, $K = 2$; (d) 35 individuals from breeder 6, $K = 3$.

A fixation index (F) was used to determine the change in inbreeding over the years. The course of changes over the years is shown in Figure 3. A spike in mean inbreeding is evident between 2012 and 2013. The highest average inbreeding level was recorded for 2016; however, this is the year for which the fewest samples were collected.

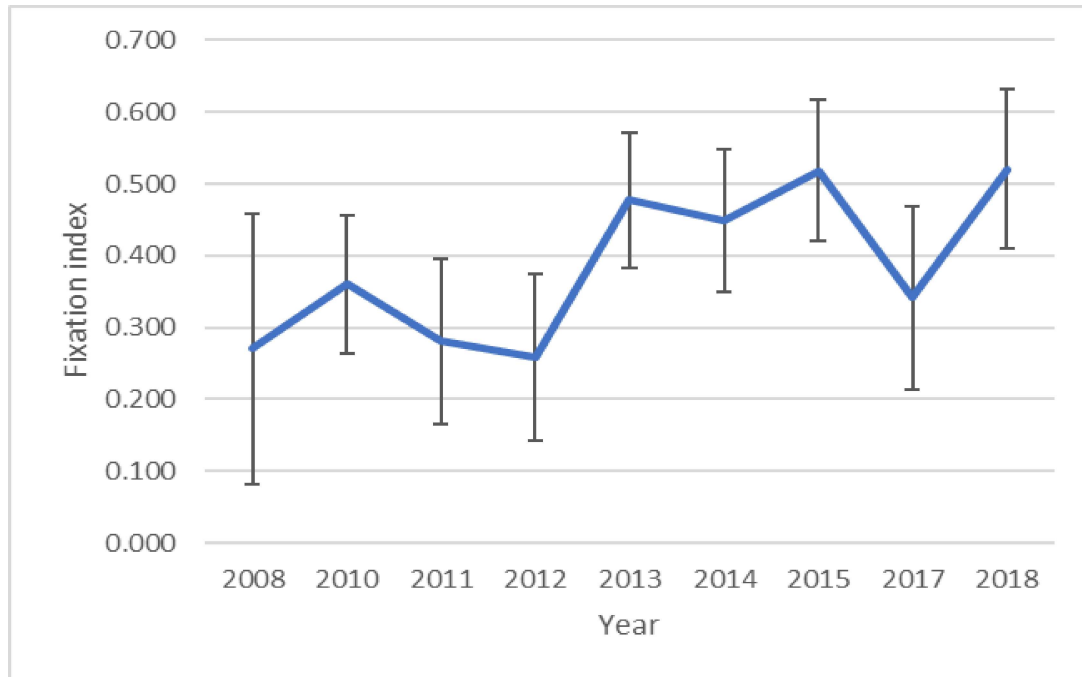


Figure 3. The plot shows the change in the average F (inbreeding) parameter over the years.

3.2. Individuals from the Six Main Providers

Multilocus genotypes were obtained in nine loci (Marker NVHfp79-4 was excluded). A total of 163 out of 170 individuals were genotyped in all loci, 5 in no loci and 2 in seven loci, and 69 individuals had a unique genotype. No null alleles were found. The number of alleles observed at the locus ranged from four to nine. The fixation index among all samples was 0.409. The genetic variability factors across all samples are presented in Table 2.

Table 2. Analysis of genetic variability for 6 main providers samples.

Locus	Allele Ranges	N	Na	Ne	Ho	He	F
NVHfp107	203–208	170	4	1.951	0.465	0.488	0.047
NVHfp13	96–103	169	8	4.161	0.349	0.760	0.540
NVHfp46_1	117–122	170	6	3.886	0.494	0.743	0.335
NVHfp5	102–108	170	4	1.709	0.082	0.415	0.801
NVHfp54	104–115	170	6	2.425	0.441	0.588	0.249
NVHfp82_2	134–140	169	5	2.509	0.195	0.602	0.675
NVHfp86_2	140–145	168	5	3.716	0.315	0.731	0.568
NVHfp89	116–132	167	9	5.598	0.575	0.821	0.300
NVHfp92_1	110–124	168	6	3.4051	0.310	0.706	0.562

N—number of scored individuals, Na—observed number of alleles, Ne—effective number of alleles, Ho—observed heterozygosity, He—expected heterozygosity, F—fixation index. For groups divided by year of collection, Nei's genetic distance varied from 0.025 (for the breeder 1–breeder 3 pair) to 0.160 (for the breeder 1–breeder 2 pair) with an average value of 0.087.

On the phylogenetic tree, shown in Figure 4, two branches can be distinguished, on one of which are breeders 1, 3 and 4 (from Germany, Slovakia and Poland, respectively) and on the other, 2, 5 and 6 (from the Czech Republic, Czech Republic and Poland, respectively).

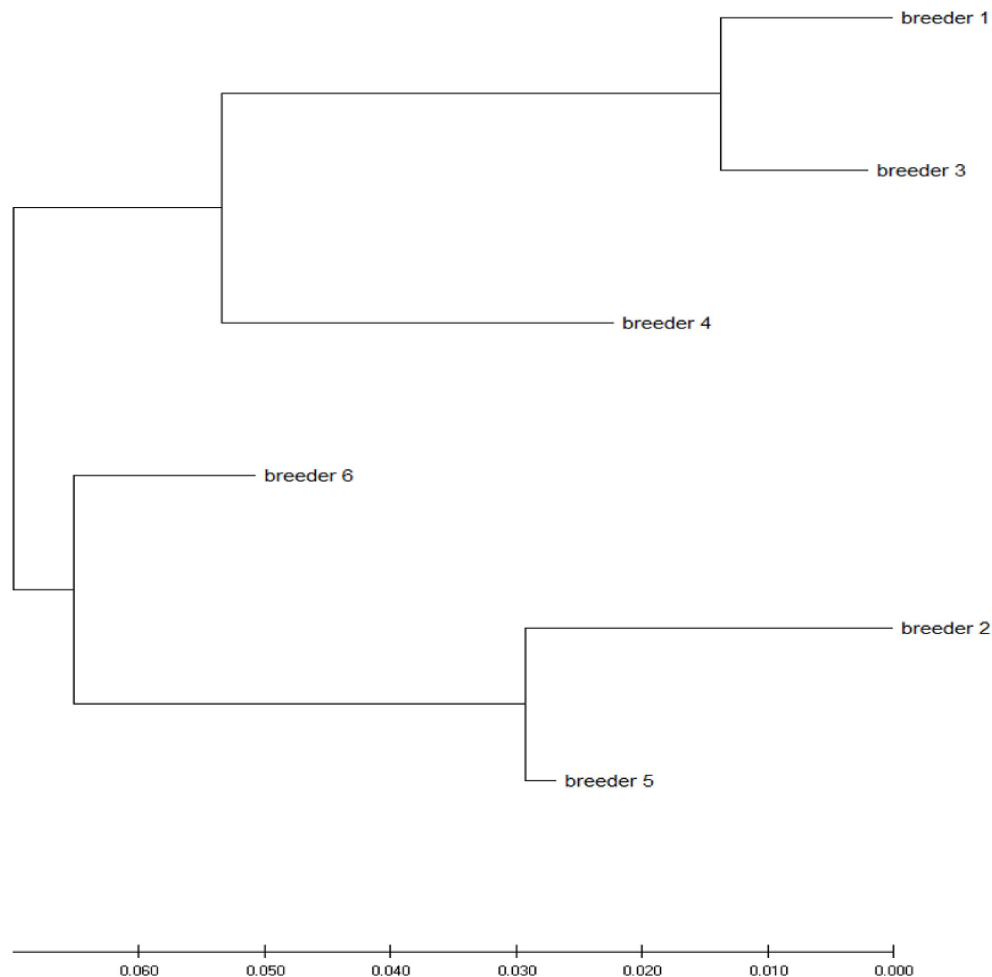


Figure 4. Nei's distance relationship among breeding groups. The distances were inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with the sum of branch length = 0.19997414 is shown. The tree is drawn to scale, and its branch lengths use the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

For the analysis of individuals from all six breeders, as for the analysis of all samples, the $K = 2$ groups best fit the data. In Figure 2b a change in genetic structure can be observed after the year 2013. The same trend is also visible in the analysis of all 374 individuals (Figure 2a). Figure 2c shows the changes in genetic structure of individuals from breeders 1 and 3. The plot in Figure 2d shows a 3-group split for individuals from breeder 6, as the analysis in STRUCTURE HARVESTER showed this to be the most likely split of individuals.

In both the analysis of all samples (Figure 3) and the analysis of the samples from the largest breeders (Figure 5), a large decrease in inbreeding in 2017 is noticeable.

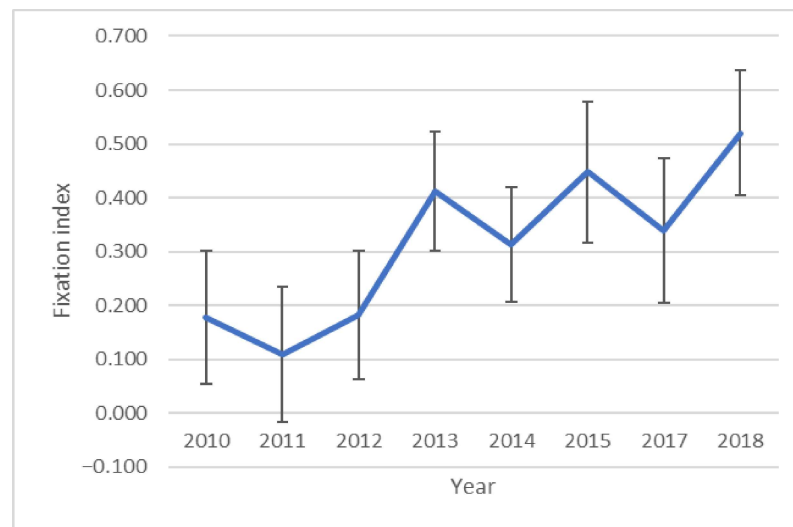


Figure 5. The change in mean F over the years for 6 main providers.

4. Discussion

4.1. Variability in the Population

Compared to our previous study, which included both breeding and wild falcons [20], the number of observed alleles for two markers was lower (NVHfp107, NVHfp92_1) and for three was higher (NVHfp5, NVHfp54, NVHfp82_2). The effective number of alleles was lower for two markers (NVHfp13, NVHfp5) and higher for the other seven. The observed heterozygosity was lower for four markers (NVHfp13, NVHfp46_1, NVHfp86_2, NVHfp89) and higher for five.

Compared to the Finnish wild population, where 145 individuals sampled over 5 years were analyzed [19], for seven markers, the number of alleles was higher, for one it was lower, and one of the markers we used (NVHfp5) was not used in this study. The observed heterozygosity was lower for six markers (NVHfp13, NVHfp54, NVHfp82_2, NVHfp86_2, NVHfp89, NVHfp92-1) and higher for two markers (NVHfp107, NVHfp46_1).

Compared to the 32 (16 wild and 16 breeding) individuals from the Czech Republic [3], the number of alleles observed was lower for three markers (NVHfp107, NVHfp86-2 and NVHfp92-1) while it was higher for three others (NVHfp13, NVHfp5 and NVHfp54). Two markers were not used in the compared study (NVHfp46_1 and NVHfp82_2). In the captive population, the observed heterozygosity was lower for five markers (NVHfp107, NVHfp13, NVHfp5, NVHfp86_2, NVHfp92_1) and higher for two markers (NVHfp54, NVHfp89).

Based on the comparisons shown, it can be concluded that the captive falcon population shows signs of genetic diversity. The large standard deviation of the F-ratio seen in Figure 3 indicates that, most likely, the birds had a very diverse ancestry, which may have influenced the smaller annual increase in inbreeding.

Breeders from Poland are on both branches (Figure 4). Birds from these breedings are more similar to birds from foreign breedings. This is evidence that breeders, thanks to the open European market, are eager to obtain birds from abroad.

Despite the demonstrated genetic similarity between breeding pairs and their offspring for the selected breeders (Figure 4), it can therefore be concluded that falcon owners maintain good breeding practices, which is particularly important in the restitution process. The two different genetic groups, as is particularly evident in Figure 4, also contributed to the slower increase in inbreeding. The fact that peregrine falcon migration is counter-intuitively not very large, probably due to the “imprinting” mechanism [2], means that wild populations of these birds do not show much genetic variability [16,17]. The system of breeding and of the exchange of birds used by falconers perhaps contributes more to the

preservation of genetic variability than the natural exchange of generations combined with the dispersal of birds in heavily populated areas of Europe.

4.2. Variability among Years

In the case of the six breeders that have been supplying individuals most regularly over the years, a change in the genetic structure of the individuals supplied is also evident (Figure 2b). Additionally, in the case of birds from breeder 6, although the analyses indicated the most likely split in three groups, the change in structure is evident. Presented in Figure 5 is a notable change in the average inbreeding level between 2011 and 2013. The differences in the pattern of change from Figure 3 are probably due to the smaller number of samples and breeders.

The reason for the drop in inbreeding in 2017 (Figures 3 and 5) may be the origin of the birds. The birds in question originated from four different breeding centers from four different countries: Germany ($n = 5$), Slovakia ($n = 2$), the Czech Republic ($n = 4$) and Poland ($n = 5$). Such different origins of the birds and the fact that these breeders, to our knowledge, do not cooperate with each other, may explain the decrease in inbreeding in 2017. In 2010, the year in which intensive restoration of the species began in Poland, the level of inbreeding, expressed by the fixation index, was relatively high (compared to, for example, the population analyzed by Mengoni et al. [33], in which the average fixation index was -0.031 (SE = 0.040)). The reason for this could be attributed to the foundations of breeding, which began in the mid-1960s when the species was already on the verge of extinction, so individuals used by falconers were allocated for intensive breeding [12]. The significant increase in inbreeding between 2013 and 2018 may be correlated with an increase in demand for falcons from breeding and being reintroduced. In 2010–2015, almost 550 birds were released under the Polish reintroduction program, much more than in the previous 20 years of its duration [12], such a large and constant demand for falcons forced an increase in the intensity of breeding; this is evident in the increase in inbreeding, and the shift over the years of the same is due to the time it took for falconers to develop their breeding regimes.

4.3. Possible Reasons for the Change in Genetic Structure

The change in the genetic structure of the samples studied is clearly visible in the structure charts (Figure 2) and occurs in late 2013 and early 2014. The demand for falcons is not high in Europe; buyers of the birds are enthusiasts, falconry hunters or bodies involved in the restoration of the species. The change in structure that we have observed has been evident since 2013/2014. Intensive reintroduction efforts in Poland began in 2010 [12], creating a relatively high and steady demand for falcons. This allowed the breeders involved in the project to expand their breeding operations and acquire new pairs. In addition, German breeders whose breeding operations had been extinguished after the successful reintroduction of the species were reactivated. This necessitated a greater exchange of birds between breeders and reaching out to new sources, such as the British Isles.

4.4. Conclusions

The idea of saving a wild species through breeding work is often criticized due to the apparently greater success of wild-to-wild translocations [5]. In the case presented in our study, it is thanks to the work of peregrine falcon breeders that a basic reintroduction population has been established, which is characterized (compared to published data to date), by good genetic parameters. The future will show to what extent the described structure will be modified in the free-living population.

The data we collected suggest an impact of increased demand for birds, associated with reintroduction, on the genetic structure of birds kept in the breeding facilities from which the birds originated. This is a factor that should be taken into account in reintroduction plans, especially when the planned activities are intensive and extend over time.

Author Contributions: Conceptualization, S.S. and Z.N.-Ż.; methodology, Z.N.-Ż. and K.O.P.; software, K.O.P.; validation, K.O.P., Z.N.-Ż., and S.S.; formal analysis, K.O.P.; investigation, Z.N.-Ż. and K.O.P.; resources, S.S.; data curation, K.O.P. and S.S.; writing—original draft preparation, K.O.P.; writing—review and editing, Z.N.-Ż.; visualization, K.O.P.; supervision, W.O.; project administration, S.S. and Z.N.-Ż.; funding acquisition, S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Operational Program Infrastructure and Environment under grant number POIS.02.04.00-00-0127/16-00. The APC was funded by the Operational Program Infrastructure and Environment “Restytucja sokoła wędrownego w Polsce” (Nr POIS.02.04.00-0127/16-00) w ramach działania 2.4.1/1/2016 oś priorytetowa II Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko 2014–2020 Konkurs 2.4.1/1/2016).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Polish Laboratory Animals Science Association (3181/2015 and 3445/2015).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of the data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Kolnegari, M.; Jamali, M.; Naserifard, M.; Ghous, K.; Hazrati, M.; Panter, C.T.; Dwyer, J.F. Falconry petroglyphs in Iran: New findings on the nexus between ancient humans and birds of prey. *Eur. J. Wildl. Res.* **2021**, *67*, 1–9. [[CrossRef](#)]
- Sielicki, S.; Sielicki, J. Restoration of peregrine falcon in Poland 1989–2007. In *Peregrine Falcon Populations—Status and Perspectives in 21st Century*, 1st ed.; Sielicki, J., Mizera, B., Eds.; Turul–Poznań University of Life Sciences Press: Warsaw, Poland; Poznań, Poland, 2009; Volume 1, pp. 699–722.
- Bryndová, M.; Putnová, L.; Bartoňová, P.; Kaplanová, K.; Urban, T. Genetic differences between wild and captive populations of the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and the saker falcon (*Falco cherrung*) living in the Czech Republic. *J. Agric. Sci. Technol. B* **2012**, *2*, 642–651.
- Wegner, P.; Kleinstäuber, G.; Baum, F.; Schilling, F. Long-term investigation of the degree of exposure of German peregrine falcons (*Falco peregrinus*) to damaging chemicals from the environment. *J. Ornithol.* **2005**, *146*, 34–54. [[CrossRef](#)]
- Seddon, P.J.; Armstrong, D.P.; Maloney, R.F. Developing the science of reintroduction biology. *Conserv. Biol.* **2007**, *21*, 303–312. [[CrossRef](#)]
- Lindberg, P. The fall and the rise of the Swedish Peregrine Falcon population. In *Peregrine Falcon Populations—Status and Perspectives in the 21st Century*; Sielicki, J., Mizera, T., Eds.; Turul–Poznań University of Life Sciences Press: Warsaw, Poland; Poznań, Poland, 2009; pp. 137–144.
- Monneret, R.-J. Evolution and current situation of the Peregrine Falcon in France. In *Peregrine Falcon Populations—Status and Perspectives in the 21st Century*; Sielicki, J., Mizera, T., Eds.; Turul–Poznań University of Life Sciences Press: Warsaw, Poland; Poznań, Poland, 2009; pp. 169–174.
- Wegner, P.; Brücher, H.; Brücher, S.; Höller, T.; Jöbges, M.; Kladny, M.; Lindner, M.; Sell, G.; Speer, G.; Thomas, T.; et al. Development of an urban population of Peregrine Falcons in North Rhine-Westphalia, Germany: Population status, nest site selection and some biological results. In *Peregrine Falcon Populations—Status and Perspectives in the 21st Century*; Sielicki, J., Mizera, T., Eds.; Turul–Poznań University of Life Sciences Press: Warsaw, Poland; Poznań, Poland, 2009; pp. 729–746.
- Heinrich, W. Peregrine Falcon recovery in the continental United States, 1974–1999, with notes on related programs of The Peregrine Fund. In *Peregrine Falcon Populations—Status and Perspectives in the 21st Century*; Sielicki, J., Mizera, T., Eds.; Turul–Poznań University of Life Sciences Press: Warsaw, Poland; Poznań, Poland, 2009; pp. 429–442.
- Banks, A.N.; Crick, H.Q.P.; Coombes, R.; Benn, S.; Ratcliffe, D.A.; Humphreys, E.M. The breeding status of peregrine falcons *Falco peregrinus* in the UK and Isle of Man in 2002. *Bird Study* **2010**, *57*, 421–436. [[CrossRef](#)]
- Petrov, R.; Andonova, Y.; Gancheva, Y.; Klisurov, I. Implications of captive breeding for the reintroduction of the Saker falcon (*Falco cherrug*) in Bulgaria. *Agric. Sci. Technol.* **2021**, *13*, 300–306. [[CrossRef](#)]
- Sielicki, S.; Sielicki, J. Falconry and the restoration of the peregrine falcon in Poland in 1990–2015. In *Falconry—Its Influence on Biodiversity and Cultural Heritage*, 1st ed.; Szymak, U., Sianko, P., Eds.; Muzeum Podlaskie w Białymstoku: Białystok, Poland, 2016; Volume 1, pp. 41–47.

13. Ivanovsky, V.; Vintchevsky, A. Status of the Peregrine Falcon in Belarus. In *Peregrine Falcon Populations—Status and Perspectives in the 21st Century*; Sielicki, J., Mizera, T., Eds.; Turul–Poznań University of Life Sciences Press: Warsaw, Poland; Poznań, Poland, 2008; pp. 117–120.
14. Brambilla, M.; Rubolini, D.; Guidali, F. Factors affecting breeding habitat selection in a cliff-nesting peregrine *Falco peregrinus* population. *J. Ornithol.* **2006**, *147*, 428–435. [[CrossRef](#)]
15. Ławicki, Ł.; Sielicki, S. Restoration of the tree-nesting population of the peregrine falcon *Falco peregrinus* in Pomerania. *Ornis Pol.* **2019**, *60*, 75–84.
16. Nesje, M.; Roed, K.H.; Bell, D.A.; Lindberg, P.; Lifjeld, J.T. Microsatellite analysis of population structure and genetic variability in peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Anim. Conserv.* **2000**, *3*, 267–275. [[CrossRef](#)]
17. Nittinger, F.; Gamauf, A.; Pinsker, W.; Wink, M.; Haring, E. Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: Mitochondrial and microsatellite data. *Mol. Ecol.* **2007**, *16*, 1497–1517. [[CrossRef](#)]
18. Jacobsen, F.; Nesje, M.; Bachmann, L.; Lifjeld, J.T. Significant genetic admixture after reintroduction of peregrine falcon (*Falco peregrinus*) in Southern Scandinavia. *Conserv. Genet.* **2008**, *9*, 581–591. [[CrossRef](#)]
19. Ponnikas, S.; Ollila, T.; Kvist, L. Turnover and post-bottleneck genetic structure in a recovering population of Peregrine Falcons *Falco peregrinus*. *Ibis* **2017**, *159*, 311–323. [[CrossRef](#)]
20. Puchała, K.O.; Nowak-Życzńska, Z.; Sielicki, S.; Olech, W. Assessment of the genetic potential of the peregrine falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) population used in the reintroduction program in Poland. *Genes* **2021**, *12*, 666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Peakall, R.; Smouse, P.E. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **2006**, *6*, 288–295. [[CrossRef](#)]
22. Peakall, R.; Smouse, P.E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2537–2539. [[CrossRef](#)]
23. Marshall, T.C.; Slate, J.; Kruuk, L.; Pemberton, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* **1998**, *7*, 639–655. [[CrossRef](#)]
24. Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **1978**, *89*, 583–590. [[CrossRef](#)]
25. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425.
26. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
27. Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **2000**, *155*, 945–959. [[CrossRef](#)]
28. Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes* **2007**, *7*, 574–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* **2003**, *164*, 1567–1587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hubisz, M.J.; Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resour.* **2009**, *9*, 1322–1332. [[CrossRef](#)]
31. Earl, D.A.; von Holdt, B.M. Structure Harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* **2012**, *4*, 359–361. [[CrossRef](#)]
32. Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: A simulation study. *Mol. Ecol.* **2005**, *14*, 2611–2620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mengoni, C.; Zuberogoitia, I.; Mucci, N.; Boano, G.; Urban, T.; Guzzo, E.; Sarà, M. Genetic variability in Peregrine Falcon populations of the Western Palaearctic region. *Ornis Hung.* **2018**, *26*, 12–26. [[CrossRef](#)]

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW

Krzysztof Pukacki

(czytelny podpis autora)