



Prof. dr hab. Mirosław Ratkiewicz
ermi@uwb.edu.pl

Białystok, 2.06.2021

Informacja na temat procedur i analiz genetycznych wykonywanych na potrzeby projektu „Powrót rysia do północno-zachodniej Polski” realizowanego przez Zachodniopomorskie Towarzystwo Przyrodnicze (ZTP)

Ryś jest szczytowym drapieżnikiem i poprzez regulację liczebności swoich ofiar zwiększa stabilność ekosystemów. Jego przywrócenie na tereny Europy przyczynia się do zmniejszenia ilości szkód powodowanych przez sarny w lasach i na polach uprawnych. Większa liczba populacji naturalnych oraz duża liczba osobników w populacjach rysia zwiększa szanse na przetrwanie tego gatunku, który po okresie eksterminacji odradza się w Europie w ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci. Dotychczasowe badania naukowe wykazały, że populacje tego drapieżnika charakteryzuje mała zmienność genetyczna oraz duże różnice między izolowanymi populacjami w Europie (Ratkiewicz i in. 2012, 2014, Rueness i in. 2014). Co więcej, najnowsze badania genomowe potwierdziły te wyniki i wskazały, że populacja karpacka rysia jest odrębna od tzw. populacji nizinnej (Lucena-Perez i in. 2020). Dlatego też na potrzeby reintrodukcji rysia w północno-zachodniej Polsce wszystkie osobniki były poddane badaniom genetycznym na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Białymstoku w celu przypisania ich do genetycznie odrębnych populacji tego gatunku oraz do ustalenia stopnia pokrewieństwa między rysiami z ogrodów zoologicznych. Badania te miały za zadanie dostarczyć informacji, które pozwoliłyby na wypuszczanie rysia wyłącznie z tzw. „nizinnej” populacji. Natomiast w przypadku stwierdzenia, że dwa osobniki różnej płci są ze sobą spokrewnione – wypuszczania ich z dala od siebie, w odległych kompleksach leśnych, by nie dochodziło do kojarzeń krewniaczych. Cele te osiągnięto poprzez analizę sekwencji regionu kontrolnego w mitochondrialnym DNA i genotypowanie rysia w starannie dobranych 20 loci mikrosatelitarnych (wyniki wykonane za ich pomocą są kompatybilne z danymi genowymi) wraz z genetyczną identyfikacją płci u ponad 120 osobników *Lynx lynx*. Ponieważ analizowane próby pochodziły z przyżyciowo pobranych próbek włosowych, traktowano je jak próby nieinwazyjne i każdą analizę powtarzano 4-6 razy, by mieć pewność, że uzyskano prawidłowy genotyp i by wyeliminować błędy w genotypowaniu. By nie dopuścić do kontaminacji obcym DNA stosowano końcówki do pipet z filtrem, kontrole izolacji DNA, kontrole negatywne reakcji PCR. Reakcję sekwencjonowania mtDNA przeprowadzano w obu kierunkach. Użyto wysokiej klasy odczynników i zestawów (Qiagen, Germany, BDT 3.1, Thermo Fisher) i pracowano na termocyklerze GenAmp 9700 (ABI) i sekwenatorze ABI3130, by zapewnić wysoką jakość wyników. Uzyskane sekwencje przyrównano do sekwencji cr mtDNA rysia zdeponowanych w GenBanku oraz do posiadanej przez realizujących badania genetyczne własnej bazy danych kilkuset rysia z Eurazji. Haplotypy poszczególnych rysia przypisano zdefiniowanym wcześniej wariantom genetycznym mtDNA, a w przypadku nowych – określono ich pokrewieństwo filogenetyczne ze znanymi wariantami genetycznymi. Wszystkie genotypy i sekwencje na bieżąco udostępniano ZTP. Analizy mikrosatelit umożliwiły przypisanie każdego badanego rysia do



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738-8383, -8414, -8416 • e-mail: biologia.dziedkanat@uwb.edu.pl



populacji źródłowej za pomocą analiz PCA (Principal Component Analysis) oraz DAPC (Discriminative Analysis of Principal Components). Obie analizy dały bardzo zbliżone wyniki i np. okazało się, że 8 z badanych osobników należało do linii karpackiej, w efekcie nie były one rekomendowane do reintrodukcji (np. Goliath i jego siostra Gotha). Analiza mikrosatelit pozwoliła też wykryć pary rodzic-potomek, rodzeństwo i kuzynów. Osobniki takie nie były rekomendowane do kojarzeń ze sobą i nie były wypuszczane na tym samym obszarze. Analizy wykonali dr Maciej Matosiuk i prof. Mirosław Ratkiewicz, którzy posiadają wieloletnie doświadczenie w badaniach z zakresu genetyki populacji, biologii molekularnej i filogenetyki ssaków, w tym rysie oraz w ostatnich 10 latach uczestniczyli w doniosłych badaniach z zakresu genetyki i genomiki tego drapieżnika. Badacze ci dysponują próbami referencyjnymi umożliwiającymi określenie przynależności genetycznej badanych rysie w celu ich reintrodukcji w północno-zachodniej Polsce. Na potrzeby projektu przebadano genetycznie przekazane przez ZTP 103 próby od 95 osobników, 12 to osobniki pochodzące z ogrodów zoologicznych wytypowane do projektu w latach 2017-2018 przez koordynatora z EAZA oraz ich potomstwo, kolejne 82 to rysie z prywatnych ośrodków hodowli, parków dzikich zwierząt i ogrodów zoologicznych, natomiast 1 osobnik urodził się na wolności. Z puli 91 przebadanych osobników urodzonych w różnych ośrodkach hodowli do reintrodukcji lub dalszej hodowli zostały zakwalifikowane 83 osobniki jako nieodbiegające istotnie od populacji bałtyckiej linii nizinnej, natomiast 8 osobników, jako odbiegające genetycznie od linii nizinnej zostały wyeliminowane z projektu.

Literatura:

1. Schmidt, K., Ratkiewicz, M., & Konopiński, M. K. (2011). The importance of genetic variability and population differentiation in the Eurasian lynx *Lynx lynx* for conservation, in the context of habitat and climate change. *Mammal review*, 41(2), 112-124.
2. Ratkiewicz, M., Matosiuk, M., Kowalczyk, R., Konopiński, M. K., Okarma, H., Ozolins, J., ... & Schmidt, K. (2012). High levels of population differentiation in Eurasian lynx at the edge of the species' western range in Europe revealed by mitochondrial DNA analyses. *Animal Conservation*, 15(6), 603-612.
3. Ratkiewicz, M., Matosiuk, M., Saveljev, A. P., Sidorovich, V., Ozolins, J., Männil, P., ... & Schmidt, K. (2014). Long-range gene flow and the effects of climatic and ecological factors on genetic structuring in a large, solitary carnivore: the Eurasian lynx. *PloS one*, 9(12), e115160.
4. Rueness, E. K., Naidenko, S., Trosvik, P., & Stenseth, N. C. (2014). Large-scale genetic structuring of a widely distributed carnivore-the Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *PloS one*, 9(4), e93675.
5. Lucena-Perez, M., Marmesat, E., Kleinman-Ruiz, D., Martínez-Cruz, B., Węcek, K., Saveljev, A. P., Ratkiewicz, M., ... & Godoy, J. A. (2020). Genomic patterns in the widespread Eurasian lynx shaped by Late Quaternary climatic fluctuations and anthropogenic impacts. *Molecular ecology*, 29(4), 812-828.

Z poważaniem
Prof. dr hab. Mirosław Ratkiewicz

Mirosław
Ratkiewicz