

LIFE
L y n x



LIFE16 NAT/SI/000634

Linee guida per il campionamento genetico non invasivo

Tomaž Skrbinšek

modificato e tradotto da

Paolo Molinari, Anja Molinari-Jobin

Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Progetto Lince Italia

Tarvisio, April 2018

Lista di controllo:

- 1. Identificazione della specie:** la genetica può essere utilizzata per identificare la specie o identificare l'individuo, o entrambi. Si prega di notare quale specie si pensa di campionare.
- 2. Stima dell'età:** la qualità del DNA si deteriora con l'esposizione alle intemperie. È fondamentale raccogliere un campione e archivarlo correttamente il prima possibile.
- 3. Raccolta del campione:** raccogliere il campione secondo le seguenti istruzioni.
- 4. Compilare le etichette:** un campione è inutile se non sappiamo dove e quando è stato raccolto!
- 5. Conservare e consegnare il campione:** conservare in un luogo fresco e buio, restituire per l'analisi il prima possibile.

L'indirizzo per inviare i campioni è:

Progetto Lince Italia
c/o Molinari
Oltreacqua 2/A
33018 Tarvisio

+39 388 746 2738
info@progettolinceitalia.it
www.progettolinceitalia.it

Guida alla stima dell'età

La stima dell'età di un campione non è mai precisa e l'aspetto di un escremento p.es. dipenderà dalle condizioni meteorologiche e dal contenuto. Tuttavia, abbiamo notato che la maggior parte delle persone può stimare quanto è fresca una fatta usando solo il buon senso, e questa stima soggettiva è di grande aiuto durante le analisi. Stimare l'età di una fatta è più facile quando sono presenti anche tracce nella neve.

Alcune indicazioni:

Un escremento fresco apparirà fresco a prima vista. Ha un odore forte, sembra umido e viscido.

Gli escrementi più vecchi potrebbero sembrare ancora freschi. L'odore sarà meno intenso, ma comunque caratteristico. Dopo 3-4 giorni l'escremento non sembrerà più viscido. Con il tempo asciutto in estate, specialmente sotto il sole, una fatta può sembrare più vecchia anche dopo un solo giorno, ma avrà ancora molto odore che indica che dovrebbe essere raccolta per la genetica.

Le fatte vecchie perdono la maggior parte dell'odore e non sono più viscite. Tali escrementi sono solitamente asciutti, ma possono essere umidi a causa di una pioggia recente. Gli escrementi molto vecchi sono senza odore, secchi e spesso di colore chiaro. Non raccogliamo campioni vecchi che non hanno odore per la genetica.

L'età degli escrementi è meno preoccupante durante l'inverno - quando una fatta fresca si congela nell'ambiente, il materiale genetico in essa contenuto verrà conservato come in un congelatore. Vale sempre la pena di raccogliere questi escrementi per la genetica.

Come campionare una fatta

Un campione viene raccolto dalla superficie dell'escremento, se possibile da una parte che non è a contatto con il terreno.

La parte della fatta che è la prima ad asciugarsi è quella che conserva la maggior parte del DNA. Se vediamo la fine della fatta (il conico "ciuffo" o "coda" che spunta da un'estremità) dovremmo provare a raccogliere un campione da lì.

Se l'escremento è stato esposto a forti piogge, provare a prelevare un campione dalla parte meno esposta.

Se c'è del muco sul campione, provare a raccoglierclo poiché contiene molto DNA.

Raccogliere un campione di dimensioni ridotte e metterlo nel flacone con liquido per la conservazione degli escrementi. Ricordate, MENO È DI PIÙ! Assicuratevi

Fatta di lince. Notare il piccolo "ciuffo" a una delle estremità, che è considerata una delle parti migliori per raccogliere un campione genetico. (Illustrazione: Igor Pičulin)





La quantità di
escremento da rac-
cogliere deve essere
piccola - circa la
dimensione di un
pisello o meno

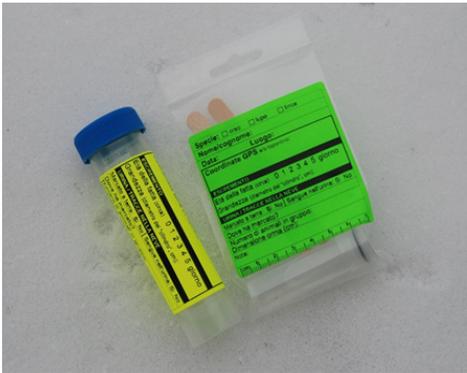
A sinistra: raccolta di un campione di fatta (con grande (50 ml) flacone per riferimento). Destra: flacone piccolo (8 ml) con un campione di una fatta. Raccogliamo POCO della fatta (grandezza di un pisello) - meglio poco che troppo! (illustrazione: Tomaž Skrbinšek)

di non raccogliere troppo dell' escremento poiché in questo caso il DNA non verrà conservato. Il liquido nel flacone non deve in alcun caso traboccare o raggiungere il bordo. Potete usare sia flaconi piccoli che grandi! Se usate quello grande (50 ml), assicuratevi di raccogliere un campione di escremento che non sia superiore alla dimensione di un pisello.

Il modo più facile per raccogliere il campione è usando i bastoncini di legno inclusi nel kit e che poi possono essere scartati nell'ambiente dopo il campionamento. Se non ne avete, potete creare uno "strumento" da un pezzo di legno o un piccolo ramo di albero. Dovreste usare nuovi "strumenti" per ogni fatta da campionare, per prevenire la contaminazione dei campioni!

Registrazione dei dati per un campione di escremento

I dati relativi al campione devono essere registrati sull'etichetta del flacone di campionamento. Se usate la fiala piccola (8 ml), riponete il flacone nella busta richiudibile con l'etichetta! Lo stesso flacone può essere usato per un campione di urina, e l'etichetta viene compilata dove necessario.



Etichette per la raccolta dati dei campioni di urina e fatte. I flaconi di grandi dimensioni hanno le etichette direttamente sul flacone.

I campioni di fatta e urina possono essere raccolti in flaconi piccoli o grandi, a seconda della convenienza.

Specie: si prega di annotare quale specie si pensa di campionare.

Nome della persona che ha raccolto la fatta.

Questo ti consentirà di ottenere un feedback sui tuoi campioni.

Data della raccolta del campione.

Coordinate: posizione in cui è stato trovato il campione. Se hai un GPS, annota le coordinate. In caso contrario, registra il nome locale (toponimo) del luogo in cui è stato trovato il campione. Si prega di annotare anche il nome più generale dell'area (p.es. Comune) in modo da poter successivamente posizionare il campione su una mappa nel modo più preciso possibile. Se non è possibile determinare la posizione precisa, raccogliere il campione e annotare una posizione approssimativa.

Età dell'escremento: Cerchiare il numero dell'età stimata dell'escremento.

Se il campione è stato raccolto **seguendo tracce nella neve**, inserire anche i dati riguardo le dimensioni della traccia e il numero di animali presenti.

Nota: annotare tutto ciò che si ritiene utile sapere, anche se avete qualche domanda particolare.

Conservare il campione e inviarlo per l'analisi

Dopo la raccolta, conservare il campione in un luogo fresco e buio. Non lasciarlo in una macchina sotto il sole!

Campioni di urina

Cercare di raccogliere il più possibile della "neve gialla" nel flacone. Rimuovere con attenzione una parte della neve intorno alla macchia gialla con l'urina per facilitare la raccolta e raggiungere le parti più profonde del flusso di urina. Quando è stato marcato un oggetto verticale, controllare anche la neve sul terreno sotto l'oggetto, poiché l'urina gocciola spesso dall'oggetto verticale. Al termine, chiudere bene il flacone per evitare perdite.



I flaconi grandi (50 ml) e piccoli (8 ml) possono essere usati in modo intercambiabile, a seconda della grandezza della fatta e/o della convenienza.

Visto che non tutti i campioni saranno genotipizzati con successo, ha senso raccogliere diversi campioni dello stesso individuo. La procedura consiste nel raccogliere i primi due campioni di urina dello stesso individuo che si trovano in flaconi separati. Quando vengono trovati campioni di urina aggiuntivi mentre si traccia lungo la stessa pista innevata dello stesso animale, devono essere raccolti (tanti quanti sono possibili) in un'unico flacone grande (50 ml) diversi

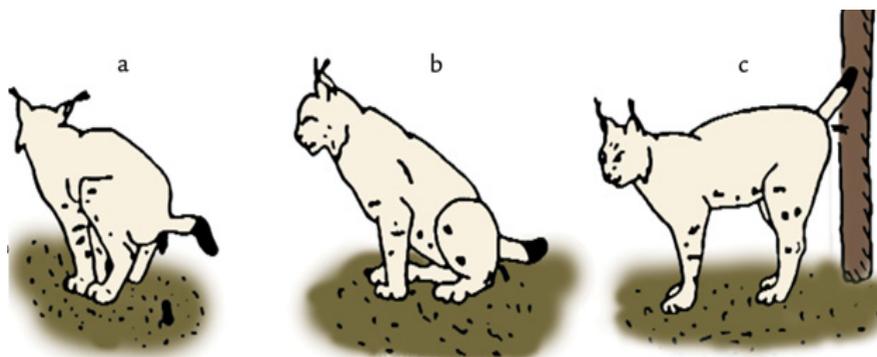
campioni nella stessa provetta. Se vengono raccolti campioni "voluminosi", dovremmo stare molto attenti che i campioni provengano realmente dallo stesso animale. In caso di dubbio, interrompere la raccolta di nuovi campioni nello stesso flacone.

Se si rileva dell'urina sul terreno (non come marcatura) quando si segue una pista di una famiglia di lince, raccoglierla come campione singolo (in un flacone separato) poiché potrebbe appartenere ad un piccolo.

Registrare i dati per un campione di urina

La maggior parte dei dati sono gli stessi come per un campione di fatta, con alcune eccezioni:

Viene registrato anche il numero di animali stimati (tracciati) e la dimensione della traccia.



Defecazione (a), urinazione (b) e marcatura (c). Mentre l'urina si trova normalmente a terra, la marcatura consiste spesso in un paio di gocce spruzzate contro un oggetto verticale (illustrazione di Hucht-Ciorga 1988).

Comportamento di marcatura / non marcatura: urina sul terreno (non marcatura) o su un oggetto (marcatura)? Se si tratta di una marcatura, specificare cosa è stato marcato (ad esempio piccolo albero, sasso, baita in legno ecc.).

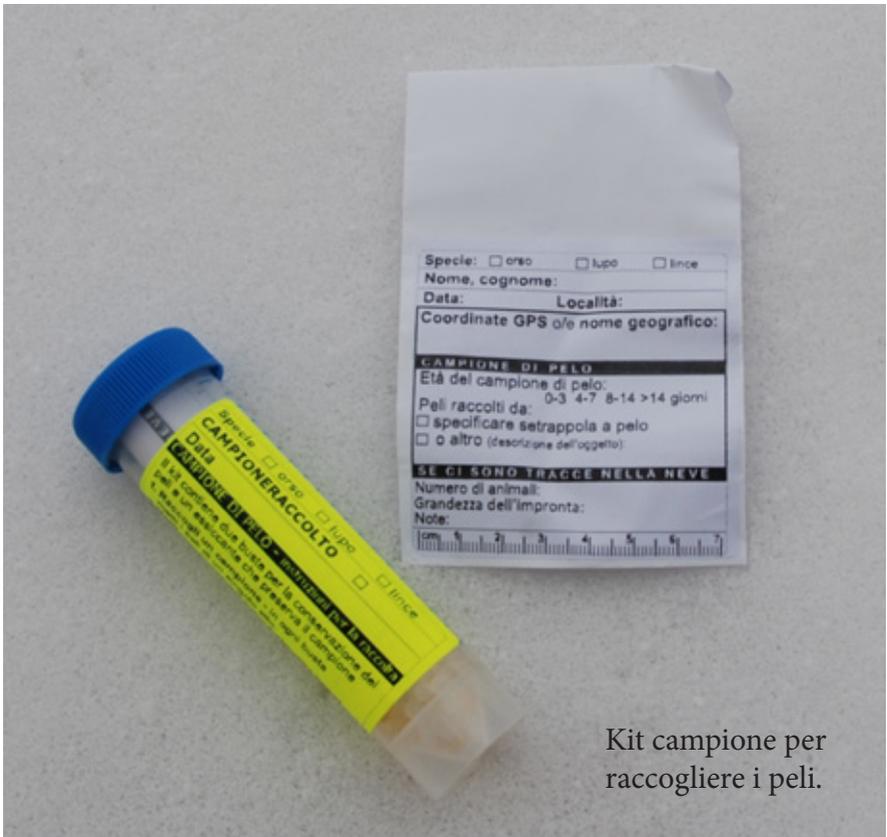
Il sangue nelle urine può essere a volte visibile dopo l'accoppiamento. Tali campioni dovrebbero essere sicuramente raccolti.

Conservare e consegnare il campione di urina

Il campione deve essere inviato per essere analizzato il prima possibile. Questo è particolarmente importante per i campioni di urina poiché si degradano più velocemente dei campioni di escrementi.

Campioni di peli

I follicoli dei peli forniscono una buona fonte di DNA. Analogamente ad altri campioni genetici non invasivi, il DNA nei campioni di peli si degraderà nell'ambiente e la probabilità che l'analisi abbia esito positivo diminuisce nel tempo. Tuttavia, a differenza dei campioni di escrementi non si conservano bene e dovrebbero essere trasferiti in un laboratorio per l'analisi il più presto possibile.



Kit campione per raccogliere i peli.

La parte dei peli che contiene il DNA è il follicolo, ovvero l'estremità bulbosa di un pelo. Non tutti i peli che si trovano avranno follicoli e sono spesso difficili da vedere senza una lente d'ingrandimento, quindi ha senso raccogliere più peli possibile. Inoltre, assicuratevi di raccogliere peli interi - spezzati sono inutili. Assicuratevi anche di raccogliere i peli del sottopelo. Ricordatevi, il pelo in sé non è molto importante quindi la sua lunghezza non ha importanza, è il follicolo che ha il DNA.

I peli vengono raccolti in una busta di carta, che viene poi conservata in un flacone di plastica o in un sacchetto di plastica richiudibile con essiccante (gel di silica). L'essiccante è fondamentale poiché asciuga il campione e conserva il DNA, ma deve trovarsi in un ambiente sigillato. La busta, d'altra parte, consente al campione di asciugarsi e lo protegge. Se necessario, è possibile inserire più buste con campioni nello stesso sacchetto di plastica / flacone con disidratante.

AVVERTIMENTO. Se esposto all'aria, l'essiccante assorbirà l'umidità e diventerà inefficace. I kit di campionamento per i peli sono sigillati sottovuoto e se il sigillo non è rotto, potremmo usarli infinitamente. Tuttavia, una volta aperto un kit, vanno usati entro un paio di giorni o buttati via se per qualsiasi motivo non è possibile raccogliere un campione.

Se ci sono diversi punti con peli sullo stesso sito, raccogliere i peli da ciascuno di questi punti in una busta diversa.

Idealmente i peli vengono raccolti con una pinzetta, che viene bruciata con una fiamma (ad esempio un accendino) prima di ogni raccolta. Tuttavia, poiché la contaminazione è meno problematica con tali campioni e il DNA umano non è un problema, potete usare in extremis anche le dita per raccogliere i peli e metterli in una busta.

Assicurarsi di sigillare bene il flacone o la busta con l'essiccante. Altrimenti l'umidità dell'aria danneggerà il campione.

Annotare i dati

La maggior parte dei dati richiesti sono gli stessi degli altri tipi di campioni, con alcune eccezioni.

Età dei peli: Non esiste un modo obiettivo per dirlo direttamente dai peli, ma spesso possiamo stimare (ad esempio se trovato seguendo tracce nella neve, è possibile stimare l'età della traccia rispetto alle ultime nevicate, condizioni meteorologiche, forma delle piste ...). In molti casi questa sarà solo una supposizione. Potete anche annotare l'intervallo di tempo dall'ultima volta che avete controllato quel sito di marcatura per peli (che fornisce l'età massima).

Peli raccolti da: annotate se i peli sono stati raccolti da una trappola a pelo o qualcos'altro. Se altro, annotare quale tipo di oggetto (ad es. albero morto, luogo di alimentazione, capanna nella foresta ...).

Archiviare e inviare il campione

In primo luogo, assicurarsi sempre che le buste con i campioni siano ben sigillate nel flacone di plastica o nella busta. Il campione deve essere inviato per essere analizzato il prima possibile.

Campioni di saliva dalla preda

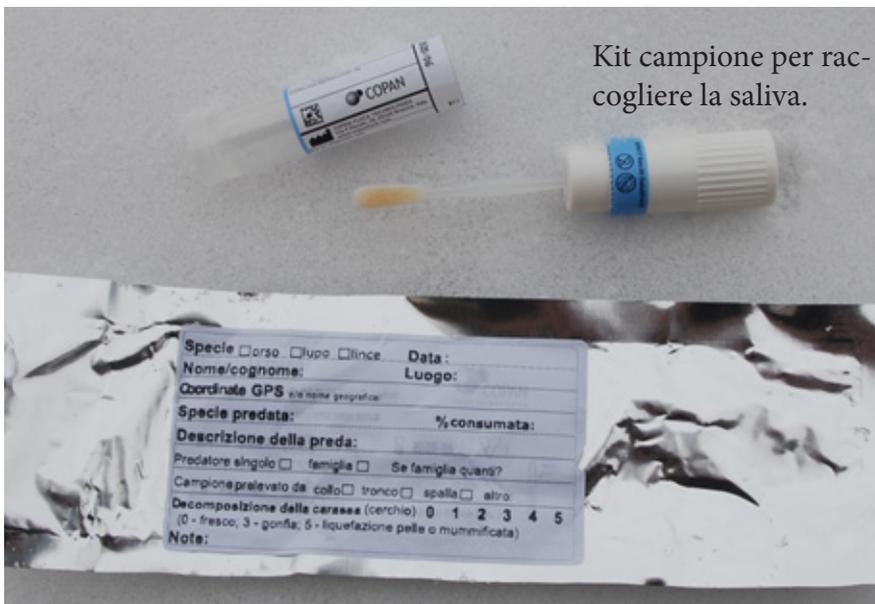
Quando troviamo una preda fresca, possiamo provare a prendere un campione di saliva intorno alle ferite da morso. Il rischio è la contaminazione con DNA dai necrofaghi. Con lince questo è un problema minore poiché la contaminazione con il DNA del più frequente necrofago, la volpe, non è un problema nell'analisi.

Trova un buon posto per tamponare

Quando il predatore morde la sua preda, lascia la saliva che contiene il suo DNA. Quindi, ovunque trovi segni di morsi, puoi provare a raccogliere il DNA nell'area circostante con un tampone. Come sempre - più fresco, meglio è.



Raccolta di un campione di saliva. Tamponare vigorosamente l'area intorno e tra le ferite da morso (in alto). Quando la carcassa è già in gran parte mangiata, provate a trovare i punti in cui pensate ci sia la più alta probabilità che la lince abbia mangiato per ultimo. (foto: Tomaž Skrbinšek).



Poiché il successo della genotipizzazione da tali campioni non è buono, raccogliere sempre 2 o 3 campioni da diversi punti della carcassa. Un campione dovrebbe sempre essere preso dal morso (il collo / la gola). Nella lince il morso rappresenta spesso solo un paio di fori con una lacerazione minima del tessuto circostante. Il resto dovrebbe essere raccolto nel luogo in cui la specie target ha mangiato più recentemente.

Utilizziamo speciali tamponi forensi che hanno l'essiccante integrato nel tubo e sono forniti in sacchetti sigillati che impediscono l'ingresso di umidità. Aprire

il sacchetto con il tampone immediatamente prima dell'uso: non aprire i tamponi se non si prevede di usarli. Se capita di dissigillare il tampone e non raccogliere il campione per qualsiasi motivo, questo tampone dovrebbe essere usato in un paio di giorni o gettato via.

Una volta identificata l'area dove credete che si trova la saliva, strofinare la punta del tampone sull'area. Non tamponare un'area troppo grande - circa le dimensioni del palmo di una mano al massimo. Raccolgiete una singola area con lo stesso tampone, ad es. un tampone per il collo, due in due punti in cui l'animale ha mangiato di recente.

Evitare di tamponare nelle aree con molto sangue perchè il tampone si inzuppa rapidamente e non raccoglie alcun nuovo materiale.

Dopo la raccolta, riporre il tampone nella provetta originale e sigillare bene. Se possibile, sigillare la connessione tra il tappo e il tubo con un nastro isolante. Un campione ermetico rimarrà conservato più a lungo.

Annotare i dati

Questo è simile ad altri tipi di campioni, con alcune eccezioni.

Specie predata, % consumata, descrizione della preda: descrivete la preda ... specie, età stimata (giovane / vecchia), sesso e condizione fisica se pos-

sibile. Stimare anche la percentuale consumata.

Predatore singolo / gruppo familiare: sembra un singolo individuo di lince o una madre con un piccolo? Nel secondo caso, provate a stimare il numero di individui (di solito possibile solo nella neve).

Campionamento da: In una preda fresca, è particolarmente importante prelevare un campione dalla ferita da uccisione (collo / gola), se possibile. Annotate da quale parte della preda è stato prelevato il campione.

Decomposizione della carcassa: lo stato di decomposizione fornisce alcune indicazioni sulla possibilità di ottenere un genotipo.

Conservare e inviare il campione di saliva

Doppio controllo se i tubi del tampone sono ben sigillati. Il campione deve essere inviato per essere analizzato il prima possibile.



LIFE16 NAT/SI/000634