



Preventing the extinction of the Dinaric-SE
Alpine lynx population through reinforcement
and long-term conservation



Priručnik za prikupljanje neinvazivnih uzoraka risa

Autor: Tomaž Skrbinšek
Prevela i prilagodila: Ira Topličanec

Za sva pitanja i dogovore oko prikupljanja i dostave uzoraka, molimo kontaktirajte:

Veterinarski fakultet:

Tomislav Gomerčić: tomislav.gomercic@gmail.com mob: 095 90 22 610

Magda Sindičić: magda.sindicic@gmail.com mob: 098 18 11 291

Ira Topličanec: ira.toplicanec@gmail.com mob: 091 91 16 766

Udruga Biom:

Ivana Selanec: ivana.selanec@biom.hr mob: 098 595 203

Veleučilište u Karlovcu:

Vedran Slijepčević: vedran.slijepcevic@gmail.com mob: 098 92 72 073

Zagreb, 2018.



Partneri u projektu



Univerza v Ljubljani



Projekt sufinanciraju



REPUBLIC OF SLOVENIA
MINISTRY OF THE ENVIRONMENT
AND SPATIAL PLANNING



FOND ZA ZAŠTITU OKOLIŠA
I ENERGETSKU UČINKOVITOST

euRONATUR



VLADA REPUBLIKE HRVATSKE
Ured za udruge

Provedba ove aktivnosti financirana je kroz Program LIFE Europske unije.

Ovaj projekt sufinancira Ured za udruge Republike Hrvatske

Stajališta izražena u ovoj brošuri isključiva su odgovornost Veterinarskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Veleučilišta u Karlovcu i Udruge Biom.

Uvod

Izmet, urin i dlaka su bitan izvor informacija o divljim životinjama, osobito kao izvor DNK za genetske analize. Neinvazivno prikupljanje uzoraka podrazumijeva dolazak do uzorka bez kontakta sa životinjom te je izuzetno važno u istraživanju i gospodarenju risom s kojim je susret na terenu izuzetno rijedak.

Svrha ovog priručnika je predstaviti metodologiju prepoznavanja i prikupljanja neinvazivnih uzoraka risa kako bi zajedno prikupili podatke o populaciji risa u Hrvatskoj ali i pridonijeli ostvarivanju ciljeva LIFE Lynx projekta.

Sretno uzorkovanje!

Prikupljanje uzorka izmeta

1. Prepoznavanje izmeta

Za prepoznavanje risjeg izmeta u prirodi, pažnju obraćamo na **veličinu, oblik, sadržaj i mjesto gdje se izmet nalazi**.



Slika 1. Izmet risa. Suženi okrajak izmeta smatra se najboljim dijelom za prikupljanje genetičkog materijala. (Crtež: Igor Pičulin, Fotografija: Franc Kljun)

Veličina: 2 – 2.5 cm u promjeru, rijetko veći

Sadržaj: Risji izmet često sadrži dlaku pojedenog plijena, ali u manjoj količini od vučjeg izmeta. Može još sadržavati komadiće kosti ili vlati trave. Ne sadrži hranu ljudskog porijekla.

Oblik: Uglavnom povezan u jednu "kobasicu" ili u više dijelova sa zavijenim krajevima.

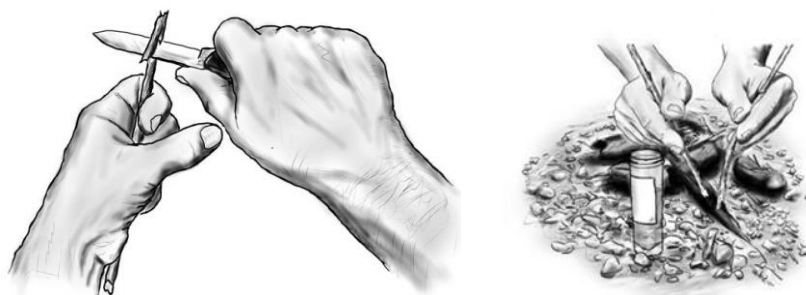
Lokacija: Ris zakapa izmet slično domaćoj mački, ali to nije pravilo, osobito kod starijih jedinki. Ipak, ako je izmet pronađen na izrazito vidljivom mjestu (sredina puta, izložena stijena..) to nam upućuje da NE potječe od risa već neke druge vrste (vuk, lisica..). Ris često ostavlja izmet uz veće kamenje, cjepanice ili debla.



Slika 2. Ris često ostavlja izmet uz veće kamenje, cjepanice ili debla. (Fotografija: Božidar Raos (lijevo), Vedran Slijepčević (desno)).

2. Uzorkovanje izmeta

Uzorak prikupljamo s površine izmeta, ako je moguće sa strane koja nije u dodiru s tlom. Ako na izmetu ima sluzi onda uzorak uzmemo s tog dijela - sluz obično sadrži najviše DNK. Prikupljamo uzorak veličine graška (manje je više u ovom slučaju). Izmet je najlakše prikupiti komadom grančice uzete iz okoliša. Bitno je za svaki uzorak koristiti novo "oruđe" kako ne bi došlo do miješanja DNK uzoraka.



Slika 3. Prikupljanje uzorka izmeta na terenu. (Crtež: Tomaž Skrbinšek)

Uzorak pohranjujemo u posudicu s tekućinom za konzerviranje (koju vam možemo dostaviti) ili u epruetu s alkoholom. Obavezno zabilježimo vrstu životinje čiji izmet smo prikupili, vaše ime, datum i lokaciju (ako posjedujete GPS, napišite koordinate), starost uzorka te opseg izmeta. Starost izmeta se najlakše procijeni po mirisu i izgledu – stari izmet gubi miris, suh je i blijedi. Ako su uzorci prikupljeni praćenjem tragova u snijegu zabilježite i podatke o tome.



Slika 4. Primjer posudice s naljepnicom na koju se unose potrebni podatci. (Crtež: Tomaž Skrbinšek)

Sažeti popis bitnih koraka pri uzorkovanju izmeta:

1. **Prepoznati vrstu životinje...** kako bi bili sigurni da je izmet zbilja risji.
2. **Pravilno prikupiti uzorak...** s površine izmeta, veličine graška.
3. **Procijeniti starost uzorka...** što svježije to bolje! Voditi se mirisom.
4. **Napisati potrebne podatke na posudicu za uzorak...** uzorak je neupotrebljiv ako ne znamo gdje i kada je prikupljen.
5. **Pravilno pohraniti i dostaviti uzorak...** čuvati na hladnom i u mraku do slanja na analizu (poslati što je prije moguće!).

Prikupljanje uzorka urina

1. Prepoznavanje

S obzirom da ris urinom označava svoj teritorij, takvih uzoraka može biti u izobilju prilikom praćenja risjih tragova u snijegu. To osobito vrijedi u doba parenja.

Prikupljanje urina jednostavno je uz odgovarajuće posudice kojima vas možemo opskrbiti na upit.



Slika 4. Risji otisak u snijegu. Trag odraslog risa je okrugao, promjera 7-9 cm. (Fotografija: Urs Breitenmoser (lijevo); Vedran Slijepčević (desno))

Prvi korak pri uzorkovanju urina je uvjeriti se da su tragovi koje pratimo zbilja risji.

Smjernice kojima se možemo poslužiti su sljedeće:

Odgovara li trag veličinom i oblikom onom risjem? Trag odraslog risa je okrugao, promjera 7-9 cm (prednje šape su veće od stražnjih). Kao većina mačaka, ris uvlači pandže dok hoda te uglavnom **ne ostavlja tragove pandži u otisku**. Budući da utvrđivanje vrste preko tragova u snijegu može biti varljivo, zaključak se ne donosi samo na osnovi jednog otiska već je bitno procijeniti **veći broj otisaka u snijegu**.

Jesu li tragovi u jednoj liniji? Uobičajeno je da su risji tragovi posloženi u jednu ravnu liniju (slično tragu vuka), dok psi primjerice „lutaju“ praveći cik-cak uzorak. Agilni risevi također koriste prijelaze preko palih stabala, stjenovite površine i prave velike horizontalne i vertikalne skokove.

Opažanje navedenog tipa ponašanja u praćenim tragovima upućuje da je praćena životinja zbilja ris.



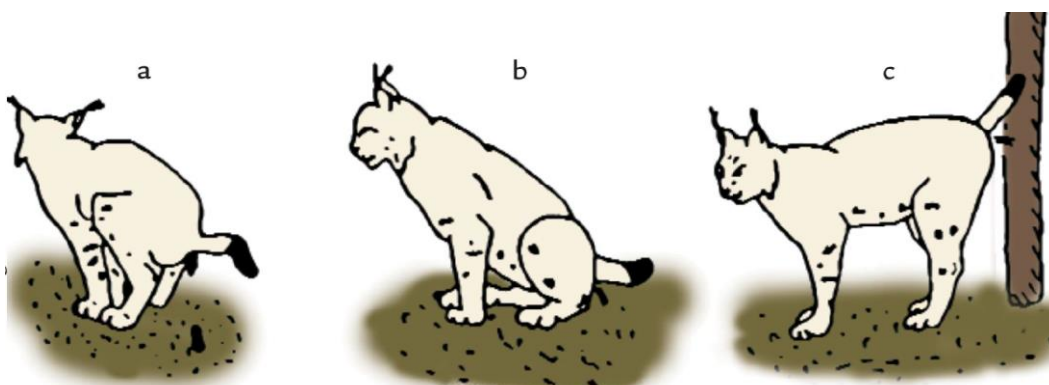
Slika 5. Za utvrđivanje vrste preko tragova u snijegu bitno je procijeniti veći broj otisaka slijedeći isti trag. (Fotografija: Franc Kljun (lijevo); Vedran Slijepčević (desno))

2. Uzorkovanje urina

Kada smo utvrdili risji trag, pristupamo uzorkovanju urina.

Budući vjerojatno neće svi prikupljeni uzorci biti uspješno genotipizirani prikupljamo veći broj uzoraka. Cilj je prikupiti što više žuto obojanog snijega u posudicu razmičući okolni neobilježeni snijeg.

Tipičan postupak je prikupiti prva dva pronađena uzorka u dvije male odvojene posude (8mL). Svaki idući uzorak na kojeg se naiđe, uz pretpostavku da cijelo vrijeme pratimo trag iste životinje, prikupljamo skupno u treću veću posudu (50mL). Ako postoji sumnja da uzorak više ne pripada istoj praćenoj životinji treba prestati prikupljati uzorke u istu posudu.



Slika 6. Defekacija (a), uriniranje (b) i markiranje (c). Ris urinira na tlo prilikom čega ostavlja veću količinu urina za sobom dok pri markiranju ostavlja nekoliko kapi urina na vertikalnim objektima. (Nacrtano prema Hucht-Ciorga 1988).

Posudice s uzorkom obilježavamo uobičajnim ispunjavanjem podataka o **vrsti životinje, vašim imenom, datumom i lokacijom te podatcima o praćenim tragovima** (pretpostavljeni broj životinja i veličina traga).

Uz uzorak urina potrebno je još navesti je li **uzorak prikupljen s markirališta** (obilan nalaz urina na podu smatra se običnim uriniranjem dok manja količina urina na objektima označava markiralište), a ako se radi o markiralištu **koji objekt je markiran** (deblo, kuća, stijena...) te **ima li tragova krvi u urinu** (normalna pojava vidljiva nakon parenja).

Sažeti popis bitnih koraka pri uzorkovanju urina:

1. **Prepoznati risji trag** kako bi bili sigurni da zbilja pratimo risa.
2. **Pravilno prikupiti uzorak** što je više moguće žuto obojanog snijega.
3. **Napisati potrebne podatke na posudicu za uzorak** uzorak je neupotrebljiv ako ne znamo gdje i kada je prikupljen.
4. **Pravilno pohraniti i dostaviti uzorak** čuvati na hladnom i u mraku do slanja na analizu (poslati što je prije moguće!).

Prikupljanje uzorka dlake

1. Prepoznavanje

Folikul dlake dobar je izvor DNK. Uzorci dlake mogu se prikupljati sistematično pomoću zamki za dlaku ili oportunistički prilikom praćenja risjih tragova u snijegu.

Risja markirališta su česta mjesta pronalaska uzorka dlake pa je osim prikupljanja uzoraka urina, potrebno pregledati to područje u potrazi za dlakom. rije nego što markira neki objekt urinom, ris se protrlja o njega, ostavljajući za sobom pokoju dlaku. Dlaka najčešće ostane pričvršćena za ispucalo drvo, grane pa čak i kamen. Ako nismo sigurni pripada li pronađena dlaka risu, potražite karakterističan miris mačjeg urina koji prati dlaku na mjestu trljanja.

Risje odmaralište drugo je mjesto gdje je moguće pronaći uzorak dlake prilikom praćenja risjih tragova. Takva uleknuća u snijegu su mjesta gdje se može naići na više od jedne dlake. Ris obično liježe na skrovita mjesta s dobrim pogledom (ispod palog stabla, kamene strehe, ruba litice i sl.)



Slika 7. Mjesto u snijegu gdje je ris odmarao. Na utabanom snijegu u sredini pronađena je

U sretnom slučaju kada smo naišli na dlaku prateći trag (za koji smo utvrdili da je risji) ipak treba prepoznati i risju dlaku što nije uvijek jednostavno. Uglavnom je svijetle boje, relativno tanka (u usporedbi s medvjedom) i često s crnim vrhom. Površinska dlaka može biti nešto deblja i duža dok unutarnji sloj krzna sadrži tanke i kratke dlake. Oba primjerka bi trebala biti prikupljena ako je moguće.



Slika 8. Primjer risjih dlaka u snježnom otisku i na deblu. (Fotografije: Vedran Slijepčević (lijevo); nepoznati autor (desno))

2. Uzorkovanje dlake

Uzorak dlake prikuplja se u papirnatu omotnicu koja se zatim stavlja u plastičnu posudicu ili vrećicu s odvlaživačem (silica-gel). Dlaku je bolje pohraniti unutar više slojeva kako bi se spriječio dotok zraka te vlaga koja može prikupljeni materijal učiniti neupotrebljivim.

Podatci zabilježeni uz uzorak odgovaraju onima kao i za prikupljene uzorke fecesa i urina, uz dodatak starosti dlake (subjektivna procjena na osnovi starosti praćenog traga ili vremenskih uvjeta) i mjesta gdje je ona pronađena (grana, drvo, kamen, zid i sl.)

Za uzorak dlake od posebne je važnosti poslati ga **što je prije moguće** iz razloga što se DNK u folikulu dlake raspada puno brže nego u prije opisanih uzoraka.

Sažeti popis bitnih koraka pri uzorkovanju dlake:

- 1. Prepoznati risji trag...** kako bi bili sigurni da zbilja pratimo risa.
- 2. Potražiti dlaku...** oportunistički uzorak moramo aktivno potražiti uz markiralište, tragove ili odmaralište.
- 3. Pravilno prikupiti uzorak...** u papirnatu omotnicu koju stavimo u plastičnu vrećicu sa zatvaračem i odvlaživačem.
- 4. Napisati potrebne podatke...** uzorak je neupotrebljiv ako ne znamo gdje i kada je prikupljen!
- 5. Pravilno pohraniti i dostaviti uzorak...** čuvati u mraku do slanja na analizu i poslati što je prije moguće!