

Metodika brūnā lāča monitoringam ar molekulārās ģenētikas metodēm

Lāču monitoringa 2020.-2022.gadā

Līgums Nr. 7.7/158/2020

Guna Bagrade, Jānis Ozoliņš, Dainis Edgars Ruņģis, Aivars Ornicāns, Digna Pilāte,

Alda Stepanova, Baiba Krivmane

LVMI "Silava"

2021



Saturs

Ievads	3
1. Ģenētisko materiālu saturoši paraugi	3
2. Paraugu ievākšanas iespējas	4
2.1. Matu lamatas	4
2.2. Fona monitorings	6
2.3. Ābeļdārzi	6
2.4. Dravu postījumu pārbaudes	7
2.5. Nejauši atradumi un ekspertīzes	9
3. Paraugu uzglabāšana līdz apstrādei laboratorijā	9
4. Paraugu apstrāde laboratorijā	10
Literatūra	12
Pielikums	14

Ievads

Brūnais lācis ir viena no trijām lielo plēsēju sugām, kura sastopama Latvijā un kurai pēdējos gados ir vērojama skaita pieauguma tendence, ienākot indivīdiem no Igaunijas un Krievijas. Šobrīd dzīvnieku skaits vērtēts 30-60 indivīdu robežās (2020.gada monitoringa dati), un nākotnē populācijas lielums Latvijā visticamāk arī turpinās palielināties.

Būtisks priekšnoteikums brūnā lāča Baltijas populācijas uzturēšanā un sugas aizsardzībā un apsaimniekošanā ir kvalitatīvi monitoringa dati. Mūsdienās molekulāri ģenētisko metožu izmantošana sugu monitoringā kļūst arvien aktuālāka. Ar šīm metodēm ir iespējams identificēt katru atsevišķu indivīdu, noteikt dzīvnieku radniecības pakāpi, tās sniedz informāciju par populācijas dzimumstruktūru un citiem parametriem, kas nozīmīgi sugas bioloģijas un ekoloģijas jautājumu noskaidrošanā.

Dokuments izstrādāts, pamatojoties uz Brūnā lāča *Ursus arctos* sugas aizsardzības plāna (2018) ieteikumiem un ar Latvijas vides aizsardzības fonda finansiālu atbalstu veiktā pētījuma “Brūnā lāča populācijas stāvokļa monitoringa uzlabošana Latvijā ar molekulārās ģenētikas metodēm” (2019) sagatavotajām *Rekomendācijām brūnā lāča populācijas stāvokļa monitoringa uzlabošanai Latvijā ar molekulārās ģenētikas metodēm* un gūto risinājumu integrēšanu Brūnā lāča fona monitoringā, ko LVMI Silava veic laikā no 2020. līdz 2022. gadam saskaņā ar līgumu Nr. 7.7/158/2020.

1. Ģenētisko materiālu saturoši paraugi

Lāču ģenētisko materiālu jeb DNS saturošo paraugu izpēte sniedz informāciju par daudziem sugas bioloģijas un ekoloģijas jautājumiem, piemēram, cik liela ir lāču populācija, kādas ir lāču vairošanās sekmes, dzimumu sadalījums populācijā, kā dzīvnieki izmanto biotopus/ainavu noteiktā apgabalā. Izmantojot ģenētisko monitoringu var noteikt ne tikai indivīdu skaitu, bet arī dzīvnieku radniecības pakāpi. Tas sniedz iespēju arī novērtēt tādas populācijas īpašības kā pašatjaunošanās spēju un imigrācijas līmeni populācijā, kā arī populācijas ģenētisko daudzveidību. Būtiski ir tas, ka paraugu ievākšanas metodes ģenētiskā monitoringa nodrošināšanā ir **neinvazīvas**, t.i. pētāmais dzīvnieks netiek tieši ietekmēts.

Ģenētisko materiālu (DNS) saturošus paraugus var iegūt no šūnām, kas atrodamas matos, ekskrementos vai siekalās. Kvalitatīvs **matu paraugs** ir mati, kas izrāvušies kopā ar sakni un tai apkārtējām ādas šūnām. **Ekskrementi** satur dzīvnieka zarnu epitēlijšūnas, savukārt **siekalas** – mutes gļotādas šūnas. Pētījumu rezultāti rāda, ka no ekskrementiem ir iespējams iegūt vairāk DNS, savukārt no matu saknēm izdalītā DNS ir kvalitatīvāka. Jāņem vērā, ka ekskrementi strauji bojājas, kā arī siekalas ilgstoši nesaglabājas, tādēļ molekulāro analīžu sekmes ir atkarīgas no paraugu svaiguma, pareizas ievākšanas un uzglabāšanas.

Jauna ģenētiskā monitoringa metode un paraugu veids balstās uz vides DNS (eDNA) - **ādas šūnu** ievākšanu **vidē**, kas atrodamas dzīvnieku pēdās sniegā. Lai ievāktu paraugu indivīda identificēšanai, nepieciešams veikt sniega parauga ievākšanu no pēdas

nospieduma pēc iespējas īsākā laikā kopš pēdas nospiedumu atstāšanas brīža, lai nodrošinātu parauga “nepiesārņošanas” ar citu organismu DNS. Tā kā metode ir jauna, nepieciešams to vēl testēt, piemēram, noskaidrot ievācamā sniega daudzumu, lai nodrošinātu pietiekamu DNS, kā arī, kuri faktori veicina molekulārajām analīzēm noderīgu paraugu iegūšanu. Latvijā ir testēta parauga ievākšana no pēdas nospieduma augsnē.

Ar paraugu molekulāro izpēti var gūt priekšstatu, taču ne pilnīgu informāciju par lāču populāciju. Ģenētiskā monitoringa papildināšana ar citām metodēm palielina izredzes pareizi novērtēt populācijas lielumu, izplatību un citus populāciju raksturojošos parametrus noteiktā teritorijā, kā arī pārbaudīt vai apstiprināt ar citām monitoringa metodēm iegūtos rezultātus.

Ģenētisko materiālu saturošie paraugi un to ieguves veidi apkopoti 1. tabulā.

1. tabula

Ģenētisko materiālu saturošie paraugi un to ievākšanas iespējas

Paraugu veidi	Ekskrementi	Mati	Siekalas	e-DNS	Nedzīvi indivīdi, ķermeņa daļas
Ievākšanas vietas					
Matu lamatas (2.1.)	x	x		x	
Fona monitoringa maršruti (2.2.)	x			x	
Ābeļdārzi (2.3.)	x	x		x	
Dravu postījumu pārbaudes (2.4.)	x	x	x	x	
Nejauši atradumi vai ekspertīzes (2.5.)	x	x	x	x	x

Paskaidrojumi: x norāda atbilstoša veida parauga ieguves iespēju, veicot vietas pārbaudi; skaitlis iekavās norāda nodaļas Nr. tekstā, kur aprakstīta parauga ievākšanas metodika.

2. Paraugu ievākšanas iespējas

2.1. Matu lamatas

Starp daudzām neinvazīvām paraugu ievākšanas metodēm sistemātisku matu lamatu izmantošanu īpaši atzīs tieši lāču pētnieki. Vispopulārākā no matu lamatām ir tā, kas izgatavota no dzelonstieplēm, jo atvieglo gan matu savākšanu, gan nodrošina, ka ieķeras lielāks matu apjoms, t.i. lielāka iespēja, ka izrāvušies būs mati ar folikuliem, kā arī šī metode samazina jauktu paraugu daudzumu.

Lai gan pie **pašreizējā** nelielā lāču blīvuma Latvijā matu lamatas **kā pastāvīga** plaša mēroga **monitoringa sastāvdaļa ir maz efektīva**, tomēr būtu vēlama to izmantošana samazinātos apmēros:

- atsevišķās vietās ar zināmu blīvāku lāču koncentrāciju ierīkot pastāvīgu matu lamatu tīklu un regulāri apsekot tās no pavasara līdz pirmajam sniegam (iespējams apkalpojot tās zemākā intensitātē vasaras mēnešos);

- periodisks (reizi piecos gados) paplašināts monitorings, veicot plašāku matu lamatu uzstādīšanu teritorijās ar lielāku lāču populācijas blīvumu, nodrošinot matu lamatas darbību uz īsu laika periodu (2 mēneši);
- NATURA 2000 teritorijās ilglaicīgi/pastāvīgi uzturēt dažas matu lamatas ar minimālu apsekošanas biežumu, lai noskaidrotu lāču klātbūtnes biežumu teritorijā; tas palīdzētu novērtēt teritorijas piemērotību un nozīmi lāču populācijas uzturēšanā arī ārpus tās robežām, īpaši tajos gadījumos, kad NATURA 2000 vietu platība ir mazāka nekā lāča individuālā teritorija.

Parauglaukumi, kuros plānots uzstādīt matu lamatas, jāizvēlas pēc šādiem pamatkritērijiem:

- Brūnā lāča fona monitoringa laikā ievāktā informācija apstiprina pastāvīgu lāča klātbūtni teritorijā.
- Parauglaukuma vieta ir salīdzinoši viegli sasniedzama.
- Zemes īpašnieks vai apsaimniekotājs neiebilst pret parauglaukuma izvietojumu.

Matu lamata ir neliels laukums, ko ierobežo starp kokiem 40-50 cm augstumā novilkta dzeloņstieple un kura centrā atrodas ietrupējis celms (vai gulošs stumbrs). Celmu reizi divās nedēļās piesūcina ar vismaz 1,5l speciāli sagatavotu šķidrumu, kas iegūts, fermentējot liellopa asinis kopā ar zivju pārstrādes atliekām. Šķidrumam ir spēcīga krituša dzīvnieka (maitas) smaka, kas piesaista tuvumā esoša lāča interesi un, pētot avotu, viņam jākāpj pāri vai jālien zem dzeloņstieples. Dzeloņstieples nebojā lāča biezo apmatojumu, matu lamatu pētījumos par lāču vai citu sugu dzīvnieku traumām nav ziņots vai dokumentēts. **Svarīgi**, lai šķidrums, ar ko piesūcina celmu, ir bez biežām frakcijām, tādejādi nodrošinot, ka lāči vietu nesaista ar iespējamu barības iegūvi.

Pie matu lamatām ieteicams izvietot slēpņa kameras, kas ļauj novērot dzīvnieku pārvietošanos un uzvedību lamatās un ap tām, kā arī koriģēt matu lamatas konstrukcijas nianses, ja tiek konstatēts, ka lācis ir tās apmeklējis, bet matu paraugu kaut kādu iemeslu dēļ nav atstājis.

Katras matu lamatas tuvumā jāizvēlas aptuveni 1km garš **maršruts/transekts**, kuru apsekot katrā apmeklējuma reizē – ceļi, grāvju nogāzes un gultne, citas vietas ar atsegtu augsnes virskārtu, kur iespējams atrast lāču pēdas un/ vai ekskrementus.

Matu lamatas to darbības laikā apseko reizi divās nedēļās (kas saistīts galvenokārt ar nepieciešamību uzturēt smakas intensitāti) saskaņā ar noteiktu sekojošo **procedūru**:

- Dzeloņstieples pārbaude un lāča matu ievākšana.
- Atmiņas kartes un bateriju nomaiņa slēpņu kamerās.
- Speciāli sagatavotā šķidruma izliešana vismaz 1,5 l apjomā uz satrunējuša koka.
- Matu lamatu tiešās apkārtnes izpēte un lāča klātbūtnes pazīmju atzīmēšana (pēdas, ekskrementi un skrāpējumi kokos) un atbilstošu paraugu ievākšana.
- Izvēlēta transekta iziešana un lāča klātbūtnes pazīmju atzīmēšana (pēdas, ekskrementi) un atbilstošu paraugu ievākšana.

Primāri ievācamais paraugu veids – **mati**; iespējami ievācamais paraugu veids – ekskrementi, svaigu pēdu nospiedumu uztriepe. Matu lamatu apsekojumu fiksē atbilstošā/piemērotā datu formātā (Word/Excel, u.c.) (2. tabula).

2. tabula

Pārskats matu lamatu apsekojumam

DATUMS		APSEKOJUMU VEICA		
MATU LAMATA NR.		KOORDINĀTES	X	
			Y	
		PAGASTS		
APSEKOJUMA APRAKSTS				
IEVĀKTIE PARAUGI				
	REĢISTRĀCIJAS NR.			
TRANSEKTA APSEKOJUMS/PRIEKŠĶEPAS IZMĒRS				
IEVĀKTAIS VIDEO/FOTO MATERIĀLS				

2.2. Fona monitoringa maršruti

Brūno lāču pēdu uzskaites izvēlētajās teritorijās veic atbilstoši uzskaišu metodikai „Brūnā lāča *Ursus arctos* fona monitorings” (http://biodiv.daba.gov.lv/fol302307/fol634754/fona-monitoringa-metodikas/ziditajdzivnieki-brunais-lacis/mon_met_fona_2013_ziditaji_lacis.doc). Konstatējot pēdas, tiek veikts priekšķepas platuma mērījums, fotofiksācija un reģistrētas vietas koordinātes.

Svaigu pēdu gadījumā augsnē – ievākts pēdas nospieduma uztriepes paraugs. Paraugu ievāc ar mitru vates kociņu, viegli pārbraucot pāri pēdas nospiedumam, īpašu uzmanību pievēršot pirkstu starpu nospiedumu vietām.

Pēdu uzskaites fiksē atbilstošā/piemērotā datu formātā (Word/Excel, u.c.) (3. tabula):

3. tabula

Pārskats pēdu uzskaitēm

DATUMS		APSEKOJUMU VEICA		
PRIEKŠĶEPAS IZMĒRS		KOORDINĀTES	X	
			Y	
IEVĀKTIE PARAUGI				
FOTO MATERIĀLS				

2.3. Ābeļdārzi

Sistemātiska ābeļdārzu pie pamestām viensētām apsekošana sniedz papildus iespēju lāču matu paraugu ievākšanai, kā arī apstiprina lāču klātbūtni teritorijā. Ābeļdārzu apsekojumi primāri veicami NATURA 2000 teritorijās vai to tiešā apkārtnē, kuras tiek apsektas fona monitoringa pēdu uzskaitēs pavasara periodā. Pirmreizējā apsekojamo

ābeļdārzu izvēle jāveic fona monitoringa pēdu uzskaišu laikā pavasara periodā un jānodrošina atkārtota ābeļdārzu apsekošana vasaras beigās – rudenī, kas sakrīt ar augļu ražas laiku. Turpmākos apsekojumus veic reizi gadā vasaras beigās – rudenī.

Veicot apsekojumu, jāpārbauda katrs augļkoks ābeļdārzā, meklējot lāča klātbūtnes pazīmes – skrāpējumus mizā. **Svarīgi** – skrāpējumi mizā var būt diezgan augstu (2m un augstāk). Ja tādi ir atrasti, rūpīgi jāapseko konkrētais koks, meklējot matu paraugus. Ābeļdārzu apsekojuma laikā ir jāpārbauda tuvākā teritorija citu lāču klātbūtnes pazīmju konstatēšanai – pēdas, ekskrementi, un nodrošinot atbilstošu paraugu ievākšanu.

Apsekojumam iespējami nepieciešamais papildaprīkojums – vieglas, saliekamas trepes, lupa un apgaismes avots.

Primāri ievācamais paraugu veids – **mati**; iespējami ievācamais paraugu veids – ekskrementi, svaigu pēdu nospiedumu uztriepe. Ābeļdārzu apsekojumu fiksē atbilstošā/piemērotā datu formātā (Word/Excel, u.c.) (4. tabula).

4. tabula

Pārskats ābeļdārzu apsekojumam

DATUMS			APSEKOJUMU VEICA	
ĀBEĻDĀRZA ID NR.			X	
			Y	
			PAGASTS	
APRAKSTS			KONSTATĒTĀS LĀČA KLĀTBŪTNES PAZĪMES	
			SKRĀPĒJUMI	
			MATI	
			EKSKREMENTI	
IEVĀKTIE PARAUGI				
	REĢISTRĀCIJAS NR.			
TERITORIJAS APSEKOJUMS/PRIEKŠĶEPAS IZMĒRS				
FOTO MATERIĀLS	IR/NAV		KOMENTĀRS	

2.4. Dravu postījumu pārbaudes

Datu vākšana par lāču nodarītajiem postījumiem ļauj konstatēt problemātiskos dzīvniekus jeb tā sauktos “meduslāčus” – indivīdus, kuri regulāri posta bišu dravas un nodara būtiskus zaudējumus biškopības nozarei. Šie dati sniedz arī pieredzi, kā uzlabot esošo preventīvo pasākumu un kompensāciju sistēmu un novērtēt tās aktualitāti, turklāt informācija ir noderīga lāču izplatības un migrācijas modeļu apzināšanai.

Apsekojot postījuma vietu, uzmanību jāpievērš salauztajām stropa daļām – kā iespējai gan matu paraugu, kas ieķērušies lūzuma vietās vai pielīpuši medū/ vaskā, gan siekalu paraugu, it īpaši, ja redzamas zobu atstātās pazīmes, ievākšanai. Teritorija jāapseko, lai konstatētu iespējamās pēdu nospiedumu pazīmes, sakošļātu vaska gabalus, kā arī skrāpējumus kokos, ekskrementus, un veiktu atbilstošo paraugu ievākšanu. **Svarīgi** – nepieciešams apsekot blakusesošo teritoriju ap izpostīto dravu, jo lācis visbiežāk rāmīšus ar medu aiznes tālākā/mierīgākā vietā no izpostītajiem stropiem. Ja teritorijas tuvumā ir kāda ūdenstece, kur lācis var atstāt kādas darbības pēdas – nepieciešams to apsekot.

Primāri ievācamais paraugu veids – **mati un siekalu (no sakošļātiem/salauztiem rāmīšiem), kā arī ekskrementu paraugi**; iespējami ievācamais paraugu veids – svaigu pēdu nospiedumu uztriepe. Dravu postījumu apsekojumu fiksē atbilstošā/piemērotā datu formātā (Word/Excel, u.c.) (5. tabula).

5. tabula

Pārskats bišu dravu apsekojumam

DATUMS	APSEKOJUMU VEICA	
BIŠU DRAVAS ID NR.	KOORDINĀTES	X
		Y
	PAGASTS	
APRAKSTS	KONSTATĒTĀS LĀČA KLĀTBŪTNES PAZĪMES	
	SKRĀPĒJUMI	
	MATI	
	SALAUZTI RĀMĪŠI	
	SALAUZTAS STROPA DAĻAS AR REDZAMĀM KODUMA PAZĪMĒM	
	SAKOŠĻĀTS VASKS	
	EKSKREMENTI	
PĒDAS		
IEVĀKTIE PARAUGI	REĢISTRĀCIJAS NR.	
TERITORIJAS APSEKOJUMS/PRIEKŠĶEPAS IZMĒRS		
FOTO MATERIĀLS	IR/NAV	KOMENTĀRS

2.5. Nejauši atradumi un ekspertīzes

Dažādus lāča DNS saturošus paraugus var ievākt arī:

- Apsekojot vietas par ziņotajām ziemas migām (matu, pēdu nospiedumu uztriepes paraugi).
- Apsekojot medījamo dzīvnieku barotavas, īpaši pavasara periodā, kad dabā ir barības trūkums, vai arī ziņojumus par konstatētiem barotavu bojājumiem – apgāztām, salauztām graudu tvertnēm, barības dozēšanas mehānismiem u.c. (matu, ekskrementu, siekalu, pēdu nospiedumu uztriepes paraugi).
- Apsekojot bojātos/plēstos skābbarības ruļļus.
- Pārbaudot plēsēju uzbrukumu gadījumus mājdzīvniekiem (atbilstoši *Mājdzīvniekiem postījumus nodarījušas plēsēju sugas identificēšana un nodarītā postījuma novērtēšana*. Vadlīnijas ekspertiem lielo plēsēju (vilku, lūšu, lāču) nodarīto bojājumu vērtēšanā).
- Veicot ekspertīzi pēc tiesības sargājošo iestāžu pieprasījuma nelikumīgi iegūtu lāču ķermeņa daļām vai priekšmetiem, kas, iespējams, atradušies saskarē ar lāča ķermeni.

3. Paraugu uzglabāšana līdz apstrādei laboratorijā

Ģenētiskajam monitoringam ievākto paraugu svaigums un uzglabāšanas veids ir ārkārtīgi svarīgs, lai tie būtu piemēroti turpmākai analīzei. Jo īsākā laikā no parauga atstāšanas brīža tas tiek ievākts, jo augstāka varbūtība ir veiksmīgai DNS izdalīšanai. Pētījumi liecina, ka vislabākie rezultāti ir paraugiem, kuri ir ievākti pirmajā dienā, t.i. vienu dienu veci; 2 vai 3 dienu veciem paraugiem rezultativitāte ir aptuveni 58%, savukārt 7 dienu un vecāku paraugu gadījumā – tikai 41%. Svaigi paraugi nozīmē arī to, ka analīzēs iegūtā informācija par dzīvnieka identitāti un dzimumu ir vairāk saistāma ar datumu, kurā paraugs ievākts.

Katram ievāktajam **paraugam** uz iesaiņojuma **pieraksta datumu** un **vietas koordinātes, parauga veidu** un **papildinformāciju**, kas var būt noderīga rezultātu interpretācijā. Paraugus ievācot jāizmanto vienreizlietojamie cimdi, lai samazinātu parauga DNS piesārņošanās risku.

Matu paraugus ievāc papīra maisiņos vai aploksnēs un uzglabā sausā vietā, istabas temperatūrā. Iespējams paraugu uzglabāt arī plastmasas maisiņā, bet tad maisiņā jāievieno silikagēls, kas uzņem lieko mitrumu.

Ekskrementu paraugus ievāc speciālos ekskrementu trauciņos ar silikagēlu un uzglabā istabas temperatūrā.

Siekalu paraugus (piemēram sakošļātus rāmīšus, vasku) ievāc papīra maisos un uzglabā istabas temperatūrā.

Svaigu pēdu nospiedumu dubļos uztriepes veic ar vates kociņiem, viegli pārbraucot pār pēdas nospiedumu, īpaši pirkstu starpu nospiedumu vietās. Lai atvieglotu uztriepes paņemšanu, vates kociņu pirms tam samitrina destilētā (vai dzeramajā) ūdenī. Vates

kociņu ar savākto parauga materiālu, nogriežot to attiecīgā garumā, ērti uzglabāt Eppendorfa stobriņā.

Svaigu pēdu nospiedumu sniegā ievākšanu veic plastmasas traukā vai aizveramajos (zip lock) plastmasas maisiņos, ievācot sniega saturu no visa pēdas nospieduma. Šādu paraugu pēc iespējas ātrāk jāievieto aukstumkārbā līdz iespējai paraugu pārlikt saldētavā (-20°).

Muskuļaudu paraugi, piemēram no bojā gājuša dzīvnieka, jāuzglabā sasaldēti -20° vai 98% etanolā.

4. Paraugu apstrāde laboratorijā

Brūnā lāča ģenētiskajā monitoringā tiek izmantotas specifiskas mikrosatelītu sekvences. Pamatojoties uz to, kvalitatīva parauga gadījumā var noteikt atsevišķus indivīdus, indivīda dzimumu, kā arī datus izmantot radniecības noteikšanā un populācijas ģenētisko pazīmju raksturošanā.

DNS izdalīšana

E.N.Z.A. Stool DNS kits izmantots DNS izdalīšanai no ekskrementiem. DNS izdalīšanai no matiem, rāmīšiem, vaska un pēdas uztriepēm izmantots *QIAamp* DNS Micro kits.

Vislabākie genotipēšanas rezultāti novērojami, ja DNS izdalīšanai izmanto dzīvnieka pavilnas kušķi vai vismaz 5 matus (vislabāk 5-10 mati). Ja matu skaits ir mazāks, tad genotipēšana lielākoties nesanāk vai sanāk slikti. Papildu iemesli, kāpēc DNS nav sekmīgi izdalīts no matu paraugiem, varētu būt arī, ka ievāktos matu paraugos nav DNS saturošās matu saknītes, vai arī, ka matu paraugs ir no citas sugas dzīvnieka, kas arī apmeklējis matu lamatu, ābeļdārzu vai lāča postījumu vietu (piem., meža cūka, meža cauna, utt.).

DNS izdalīšanai no ekskrementiem vislabāk uz vienu paraugu vienai izdalīšanas reizei ņemt apmēram 300-500 mg ekskrementus (aptuveni – pupas lieluma). No ekskrementiem materiālu vieglāk izmantot, ja tas uzglabāts silikagēlā. Nav būtiski, vai izdalīšanas laikā ekskrementi ir jau izžuvuši silikagēlā vai nē, abos gadījumos sekmes ir vienlīdz labas. Nav vēlams paraugu saldēt (īpaši, ja ievākts viss ekskrements), jo tas apgrūtina paņemt analīzēm nepieciešamo daudzumu.

Sekmīga DNS izdalīšana no pēdu uztriepēm ir atkarīga no tā, vai tiek ievāktas epitēlija šūnas. No pēdas nospieduma var izdoties sekmīgi identificēt sugu, taču gadījumā, kad nospiedums pats jau to norāda, ir būtiski noteikt dzīvnieka identitāti populācijā un/vai dzimumu. Epitēlija šūnu klātbūtne un DNS saturs ir atkarīgas no pēdas nospieduma vecuma, kā arī dažādiem vides apstākļiem – saules gaismas intensitātes, nokrišņiem utt.

Genotipēšana un ģenētiskās pases iegūšana

Izmantotie marķieri un protokoli ir saskaņā ar Norvēģijā un citās ziemeļvalstīs izmantotām metodēm, kas dod iespēju salīdzināt iegūtos rezultātus ar citās laboratorijās iegūtajiem (Kopatz et al. 2019).

Paraugs tiek uzskatīts kā sekmīgi identificēts, ja genotipēšanas dati ir iegūti ar vismaz 8 no 12 izmantotiem marķieriem (1. pielikums), un ja nav neskaidri vai grūti interpretējami rezultāti (piemēram, nespecifiska fragmentu amplifikācija, vai neparedzētu fragmentu klātbūtne). Salīdzinot parauga genotipus, iespējams identificēt unikālos genotipus (ģenētiskā pase), kas liecina, ka tie ievākti no atšķirīgiem indivīdiem. Ar visaugstāko ticamību ir indivīdi ar ģenētiskām pasēm, kas atkārtoti iegūti no vairākiem paraugiem. Tādos gadījumos iespējams arī izmantot paraugus ar zemāku kvalitāti (sekmīgi genotipētu marķiera skaitu – 6/12 marķieriem), ja tie sakrīt ar augstākas kvalitātes paraugiem, un genotipēšanas datus nav pazīmju, ka paraugs varētu būt no cita indivīda. Tas arī dod iespēju salīdzināt paraugu metadatus (paraugu ievākšanas vieta, datums utt.), kas sniedz papildus informāciju par ģenētiskās pases ticamības pakāpi.

Dzimumu nosaka, izmantojot marķierus, kuri amplificē fragmentus no X un Y hromosomām. Paraugiem, kuri ievākti no mātītēm (kurām ir 2 kopijas X hromasoma), sekmīgā genotipēšanas gadījumā amplificē vienu fragmentu, bet paraugiem, kuri ievākti no tēviņiem (kuriem ir viena Y hromasoma un viena X hromasoma), sekmīgā genotipēšanas gadījumā amplificē divus papildus fragmentus (kopā trīs fragmentus). Jāturpina pilnveidot protokolu dzimuma noteikšanai, jo līdz šim pētījumos Latvijā sekmīgi analizēto paraugu skaits bija zems, un nav pietiekami liels pozitīvo kontroles paraugu skaits (paraugi, kuri ievākti no dzīvniekiem, kuriem dzimums noteikts ar citām metodēm).

Indivīda ģenētiskās pases var izmantot indivīda radniecības analīzēm, populācijas daudzveidības un izcelsmes analīzēm. Šādām analīzēm nepieciešams iegūt augstas kvalitātes genotipēšanas datus, kā arī izmantot metodes, kuras ir izmantotas citos pētījumos, nodrošinot datu salīdzināšanas iespējas. Paraugu dzimumu noteikšana un metadati (paraugu ievākšanas vieta un laiks) ir arī ļoti svarīgi datu interpretācijai un populācijas raksturošanai.

Literatūra

Aarnes, S.G., Kopatz, A., Eiken, H.G., Schregel, J., Aspholm P.E., Ollila, T., Makarova, O., Polikarpova, N., Chizhov, V., Ogurtsov, S. Hagen, S.B. 2015. Monitoring of the Pasvik-Inari-Pechenga brown bear population in 2015 using hair-trapping. Nibio Report, Vol. 1, No. 69, 32 pp.

Ambarlı, H., Mengüllüoğlu D., Fickel, J., Förster, D.W. (2018), Population genetics of the main population of brown bears in southwest Asia. PeerJ 6:e5660; DOI 10.7717/peerj.5660

Bagrade, G., Ornicāns, A., Ozoliņš, J., Žunna, A. 2019. Mājdzīvniekiem postījumus nodarījušas plēsēju sugas identificēšana un nodarītā postījuma novērtēšana. Vadlīnijas ekspertiem lielo plēsēju (vilku, lūšu, lāču) nodarīto bojājumu vērtēšanā. LVMI "Silava", 42 lpp. (<http://www.silava.lv/24/section.aspx/View/229>)

Berezowska-Cnota T, Luque-Ma' rquez I, Elguero-Claramunt I, Bojarska K, Okarma H, Selva N. 2017. Effectiveness of different types of hair traps for brown bear research and monitoring. PLoS ONE 12(10): e0186605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186605>

Bojārs, E., Ruņģis, D.E., Ornicāns, A., Ozoliņš, J., Veinberga, I., Krivmane, K., Beļviča, V., Bagrade, G. (2019). Rekomendācijas brūnā lāča populācijas stāvokļa monitoringa uzlabošanai Latvijā ar molekulārās ģenētikas metodēm. LVMI "Silava", 9 lpp.

DeBarba, M., Waits, L.P., Garton, E.O., Genovesi, P., Randi, E., Mustoni, A., Groff, C. 2010. The power of genetic monitoring for studying demography, ecology and genetics of a reintroduced brown bear population. *Molecular Ecology* 19, 3938–3951

Dumond, M., Boulanger, J., Paetkau, D. 2015. The Estimation of Grizzly Bear Density Through Hair-Snagging Techniques Above the TreeLine. *Wildlife Society Bulletin*, Vol. 39, No. 2, 390-402

Frosch, C., Dutsov, A., Zlatanova, D., Valchev, K., Reiners, T.E., Steyer, K., Pfenninger, M., Nowak, C. 2014. Noninvasive genetic assessment of brown bear population structure in Bulgarian mountain regions. *Mammalian Biology* 79 (2014), 268-276

Jerina, K., Jonozovič, M., Krofel, M., Skrbinšek, T. 2013. Range and local population densities of brown bear *Ursus arctos* in Slovenia. *European Journal of Wildlife Research* 59(4), 1-9

Kopatz, A., Eiken, H.G., Aspholm, P.E., Tobiassen, C., Banken Bakke, B., Schregel, J., Ollila, T., Makarova, O., Polikarpova, N., Chizhov, V., Hagen, S.B. 2011. Monitoring of the Pasvik-Inari-Pechenga brown bear population in 2007 and 2011 using hair-trapping. *Bioforsk Report*, Vol. 6, No. 148, 27 pp.

Kopatz, A., Eiken, H.G., Hagen, S.B., Ruokonen, M., Esparza-Salas, R., Schregel, J., Kojola, I., Smith, M.E., Wartiainen, I., Aspholm, P.E. and Wikan, S., 2012. Connectivity and population subdivision at the fringe of a large brown bear (*Ursus arctos*) population in North Western Europe. *Conservation Genetics*, 13(3), pp.681-692.

Kopatz, A., Kleven, O., Kindberg, J., Kojola, I., Aspi, J., Spong, G., Gyllenstrand, N., Dalén, L., Fløystad, I., Hagen, S.B. and Flagstad, Ø., 2019. Estimation of gene flow into the Scandinavian brown bear population.

Kruckenhauser, L., Rauer, G., Daubl, B., Haring, E. 2009. Genetic monitoring of a founder population of brown bears (*Ursus arctos*) in central Austria. *Conserv Genet* 10:1223–1233 DOI 10.1007/s10592-008-9654-6

Monterroso, P., Rich, L.N., Serronha, A., Ferreras, P., Alves, P.C. 2014. Efficiency of hair snares and camera traps to survey mesocarnivore populations. *European Journal of Wildlife Research*, Vol. 60, No. 2, 279-289

Ozoliņš, J. 2013. Brūnā lāča *Ursus arctos* fona monitorings, 6 lpp.

http://biodiv.daba.gov.lv/fo1302307/fo1634754/fona-monitoringa-metodikas/ziditajdzivnieki-brunais-lacis/mon_met_fona_2013_ziditaji_lacis.doc

Ozoliņš, J., Lūkins, M., Ornicāns, A., Stepanova, A., Žunna, A., Done, G., Pilāte, D., Šuba, J., Howlett, S.J., Bagrade, G. 2018. Brūnā lāča *Ursus arctos* sugas aizsardzības plāns. LVMI "Silava", Salaspils, 59 lpp.

https://www.daba.gov.lv/upload/File/DOC_SAP/SAP_brunais_lacis_18_LV.pdf

Pauli, J.N., Hamilton, M.B., Crain, E.B., Buskirk, S.W. 2008. A Single-Sampling Hair Trap for Mesocarnivores. *The Journal of Wildlife Management*, Vol. 72, No. 7 (Sep., 2008), 1650-1652

Rovang, S., Nielsen, S.E., Stenhouse, G. 2015. In the trap: detectability of fixed hair trap DNA methods in grizzly bear population monitoring. *Wildlife Biology* 21: 68–79. doi: 10.2981/wlb.00033

Tallmon, D.A., Belleman, E., Swenson J.E., Taberlet, P. 2004. Genetic monitoring of Scandinavian brown bear effective population size and immigration. *Journal of Wildlife Management* 68(4):960–965

Zedrosser, A., Støen, O.-G., Sæbø, S., Swenson, J.E. 2007. Should I stay or should I go? Natal dispersal in the brown bear. *Animal Behaviour*, 74, 369-376

Wielgórska, K., Gruszczynska, J. 2019. Evaluation of the effectiveness of the monitoring methods in the aspect of the population and distribution of the brown bear (*Ursus arctos*). *Acta Sci. Pol. Zootechnica*, 18(4), 5–12. DOI: 10.21005/asp.2019.18.4.01

1. pielikums

Lāču indivīdu genotipēšanā un dzimuma noteikšanai izmantotie marķieri

Lokuss	Praimeri	Praimeru sekvenses (5'-3')	Iezīme
G10B	G10BF	ATTTTCTTGAGGACTTTTGCATATA	6-FAM
	G10BR	GTTTCTTAACCTCCATCCATAACAACAAC	
G1A	G1AF	ACCCTGCATACTCTCCTCTGATG	6-FAM
	G1AR	GCACTGTCCTTGCGTAGAAGTGAC	
G1D	G1DF	TCTCTTTTCCTTTAGGGGACTC	TMR
	G1DR	CTAGCACCCAGCAAGGTATAATA	
Mu15	MU15F	CATCTGAATTATGCAATTAACAGC	HEX
	MU15R	GTTTCTTGTTTTTGTTTAGCAGGTTTGTCTC	
Mu50	MU50F	GTCTCTGTCATTTCCCCATC	HEX
	MU50R	GAGCAGGAAACATGTAAGATG	
Mu09	MU09F	GCCAGCATGTGGGTATATGTGT	6-FAM
	MU09R	GTTTCTTAGCAGCATATTTTTGGCTTTGAAT	
Mu51	MU51F	GCCAGAATCCTAAGAGACCT	TMR
	MU51R	GTTTCTTGAAAGGTTAGATGGAAGAGATG	
G10L	G10LF	CAGGACAGGATATTGACATTGA	6-FAM
	G10LR	GATACAGAAACCTACCCATGCG	
Mu05	MU05F	ATGTGGATACAGTGAATAGACC	TMR
	MU05R	GTTTCTTGTGACATGAACTGAACTTGTTAT	
Mu59	MU59F	GCTGCTTTGGGACATTGTAA	HEX
	MU59R	GTTTCTTCAATCAGGCATGGGGAAGAA	
MU23	MU23F	GCCTGTGTGCTATTTTATCC	6-FAM
	MU23R	GTTTCTTTTGCTTGCCTAGACCACC	
Mu10	MU10F	TTCAGATTCATCAGTTTGAC	HEX
	MU10R	TTTGTATCTTGGTTGTCAGC	
Dzimuma marķieri			
X-hromosoma (ZFX)	ZFXF	AAAGAAATCCCTCAAACACGTTAC	6-FAM
	ZFXR	TCGCCACCCRCAAATAG	
Y-hromosoma (318.2)	318.2F	AAGAAAAGTCATGCAACAGATACAG	6-FAM
	318.2R	TGATGCTTTGTGATCCTAATGTG	
Y-hromosoma (SMCY)	SMCYF	GTCTTCCTCCTTAGAGGGTAATTAGG	6-FAM
	SMCYR	TTCGTTTGATAATGGCCTAAAACCTG	