



Pārskats par neinvazīvā ceļā iegūto datu novērtējumu

Pētījums: Pilotpētījums neinvazīvā ceļā iegūtu DNS saturošu paraugu izmantošanai lūšu populācijas stāvokļa monitoringā

Līguma Nr.: 6-1/21/57

Izpildes laiks: 02.04.2021. – 31.06.2022.

Izpildītājs: Latvijas Valsts mežzinātnes institūts Silava

Pētījuma vadītāja: Guna Bagrade

Darba izpildītāji: Jānis Ozoliņš, Dainis Edgars Ruņģis, Aivars Ornicāns,
Krišs Bitenieks, Baiba Krivmane, Indra Berga, Inese Lukšo,
Jānis Putns, Vilnis Goldbergs, Alessandro Di Marzio,
Guna Bagrade

Salaspils, 2022

Saturs

Ievads	3
1. DNS saturošu paraugu izmantošana	5
1.1. Paraugu neinvazīvā ieguve	5
1.2. Paraugu apstrāde	12
2. Iegūto datu novērtējums	18
3. Secinājumi	27
4. Pateicības	28
5. Literatūra	28
 Pielikumi	

Ievads

Eirāzijas lūsis ir lielākais kaķu dzimtas pārstāvis un trešais lielākais plēsējs Eiropas savvaļā. Eiropā ir 11 Eirāzijas lūšu populācijas, tomēr daudzas no tām joprojām saskaras ar izzušanas draudiem (Breitenmoser et al. 2000, von Arx et al. 2004, Sunquist and Sunquist 2009, Kaczensky et al. 2013, Chapron et al. 2014, Boitani et al. 2015). Eirāzijas lūsis Eiropas mērogā ir apdraudēta suga, Latvijā sugas aizsardzību paredz Eiropas Padomes direktīvas 92/43/EEK par dabisko dzīvotņu, savvaļas faunas un floras aizsardzību IV pielikums. Kopš 2022. gada Eirāzijas lūsis Latvijā ir iekļauts īpaši aizsargājamo sugu sarakstā (MK noteikumi Nr. 396 (14.11.2000.), grozīts ar MK noteikumiem Nr.226, 20.04.2022.). Lai saglabātu sugas dažādo populāciju dzīvotspēju, ir vajadzīgi turpmāki sugas aizsardzības pasākumi, tostarp efektīva monitoringa sistēma, kas ir jebkuras veiksmīgas sugas aizsardzības programmas svarīga daļa (Hočevar et al. 2020, KORA Foundation 2022).

Lielo plēsēju monitoringā iegūtie dati var būt oportūniski (nejauši) vai sistemātiski ievākti. Lai gan oportūniski ievākti dati ir reāli un svarīga daudzu monitoringa programmu sastāvdaļa, un šāda datu vākšana var būt efektīva ieguldītā darba un izmaksu ziņā, tomēr tie var radīt neobjektivitāti un samazināt gala rezultātu kvalitāti. Tāpēc datus vēlamus sistemātiski vākt – šādi iegūti dati būtu monitorings, kas atbilstu labākai zinātniski akceptētajai praksei. Galvenie parametri, kuriem ikvienas sugas monitoringā nepieciešams sekot, ir sugas izplatība, populācijas lieluma vērtējums un tā izmaiņas (konkrētās teritorijas robežās), kā arī veselības un ģenētiskais stāvoklis. Eirāzijas lūšu populācijas monitoringam ir zināmas vairākas lauka metodes un analītiskie rīki šo parametru ieguvei, kuru izmantošana atkarīga no sugas aizsardzības mērķa, apsaimniekošanas plāna, administratīvās kārtības un resursiem, taču arī no konkrētās populācijas stāvokļa un vides apstākļiem, piemēram, sniega segas esamības un noturības (Hočevar et al. 2020, KORA Foundation 2022).

Atbilstoši *Key actions for Large Carnivore populations in Europe* (Boitani et al. 2015) kā viens no nozīmīgajiem uzdevumiem ir monitoringa metožu standartizācija. Harmonizēt monitoringa metodes un iegūt salīdzināmus parametrus ilgtermiņā un visā sugas areālā ir visu monitoringa izpildītāju pagaidām neizpildīts uzdevums. Arī Baltijas lūšu populācijā dati dažādās valstīs tiek ievākti pēc dažādām metodēm un ar atšķirīgu regularitāti, un trūkst salīdzināmu datu. Līdz šim Latvijā darbojās monitoringa sistēma, kas balstīta tikai uz nomedītu un bojāgājušu indivīdu apzināšanu un izpēti, un kalpoja ilgspējīgām medībām nepieciešamai uzraudzībai, bet nebija pietiekoši droša, lai savlaicīgi konstatētu populācijas stāvokļa pasliktināšanos un nepieļautu nelabvēlīga stāvokļa iestāšanos citu faktoru ietekmē (Schmidt et al. 2021, Ozoliņš et al. in press). Medību procesā iegūtais materiāls ir oportūnisks (nejaušs) un jāatzīst, ka Latvijā trūkst salīdzināmu datu, kas iegūti ar neinvazīvām un sistemātiski izplānotām metodēm.

Latvijā Eirāzijas lūša *Lynx lynx* sugas aizsardzības plāna mērķis ir saglabāt lūšu populācijas labvēlīgu stāvokli Latvijā neierobežoti ilgā laika posmā un veicināt labvēlīga stāvokļa uzturēšanu Baltijas lūšu populācijā, nenosakot maksimāli pieļaujamo skaitu un dzīvesvietu daudzumu, bet nodrošinot lūšu kā vienota un funkcionāla dzīvās dabas komponenta klātbūtni cilvēku apdzīvotās un apsaimniekotās ainavās, vienlaikus respektējot un veicinot dažādi nodarbinātās sabiedrības dzīves kvalitāti un labklājību. Kā viens no sugas aizsardzības plāna ilgtermiņa uzdevumiem minēts: “Populācijas stāvokļa novērtēšanā izmantot uz vienotu metodiku balstītu monitoringa sistēmu savstarpēji salīdzināmu datu ievākšanai, kā arī ieviest un uzturēt vienotu monitoringa datu bāzi, kas informācijas drošības prasību robežās pieejama visiem ieinteresētajiem lietotājiem trīs Baltijas valstīs. Monitoringa sistēmai jānodrošina neinvazīvā ceļā iegūti dati par sugas izplatību, skaita izmaiņu vērtējumu un reprodūktīvo mātīšu daudzumu populācijā” (Ozoliņš et al. 2017).

Pētījumā “*Pilotpētījums neinvazīvā ceļā iegūtu DNS saturošu paraugu izmantošanai lūšu populācijas stāvokļa monitoringā*” plānots novērtēt neinvazīvā monitoringa metožu – matu lamatas un slēpņu kameras – efektivitāti Latvijas apstākļos un iegūto paraugu – matu, urīna, ekskrementu un pēdu nospiedumu – analīžu rezultātus, radot priekšnoteikumus un izstrādājot rekomendācijas tālākai Eirāzijas lūšu monitoringa sistēmas pilnveidošanai.

1. DNS saturošu paraugu izmantošana

1.1. Paraugu neinvazīvā ieguve

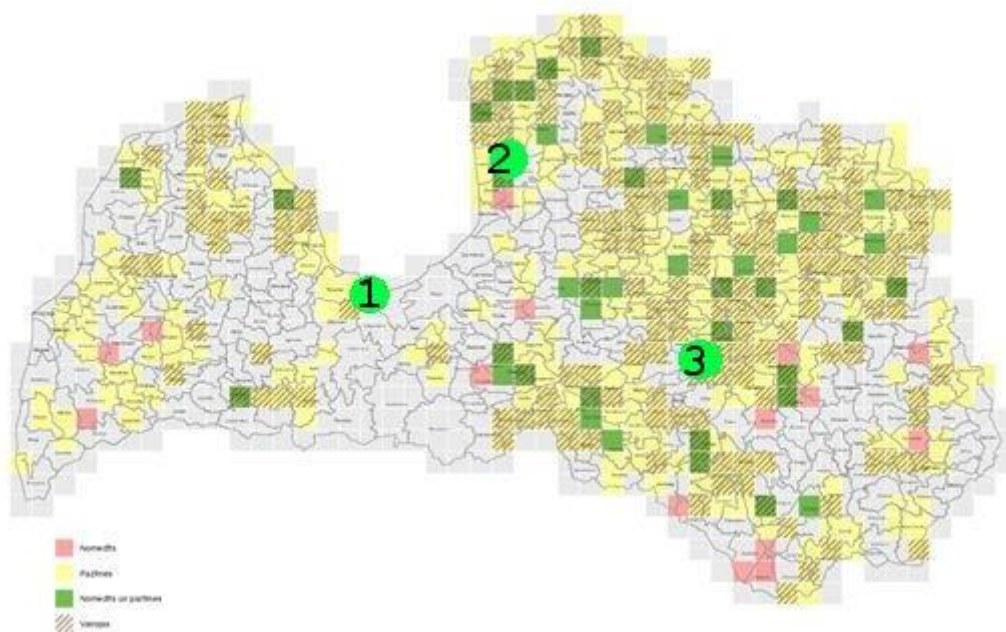
Pētījuma teritorija un paraugu ieguves metodes

Latvijā līdz 2020./21. gada medību sezonai lūšu izplatībai un skaita vērtējumam galvenokārt izmantoti dati par katras medību sezonas rezultātiem (1. attēls). Dati satur informāciju par reģistrētajām klātbūtnes pazīmēm (novērots tieši, pēdas), kas iegūta ar neinvazīvām metodēm (tiek reģistrēti kopš 2017./2018. gada medību sezonas), un informācijas par nomedītajiem un bojā gājušajiem indivīdiem (Valsts meža dienests). Līdzšinējie ilglaicīgi pētījumu dati par lūšu populācijas skaita dinamiku liecina par lūšu skaita stabilitāti kopš 2015. gada (LVMI “Silava” 2020).

Dotā pētījuma norises laikā tika vērtēta neinvazīvā monitoringa metožu – matu lamatas un slēpņu kameras – efektivitāte Latvijas apstākļos. Pamatojoties uz Valsts meža dienesta ievāktu informāciju un šī pētījuma autoru individuālo pieredzi, metožu vērtējumam izvēlēti trīs veidu parauglaukumi (1. attēls):

- a. teritorija, kur lūšu populācijas blīvums vai apmeklēšanas intensitāte ir augsta un notika to regulāra nomedīšana – matu lamatas izvietojot SIA Rīgas meži, Katrīnas mežniecības apsaimniekotajā teritorijā Viļķenes pagastā (turpmāk tekstā – Viļķene);
- b. teritorija, kur lūšu populācijas blīvums ir neliels vai apmeklēšanas intensitāte zemāka un dzīvnieki tika nomedīti retāk – matu lamatas izvietojot Meža pētīšanas stacijas Kalsnavas informācijas centra apsaimniekotajā teritorijā Kalsnavas un Aiviekstes pagastos (turpmāk tekstā – Kalsnava);
- c. teritorijā, kuru lūši apdzīvo, bet to medības nenotiek – matu lamatas izvietojot Ķemeru nacionālā parka apsaimniekotajā teritorijā Džūkstes, Slampes un Valgundes pagastos (turpmāk tekstā – ĶNP).

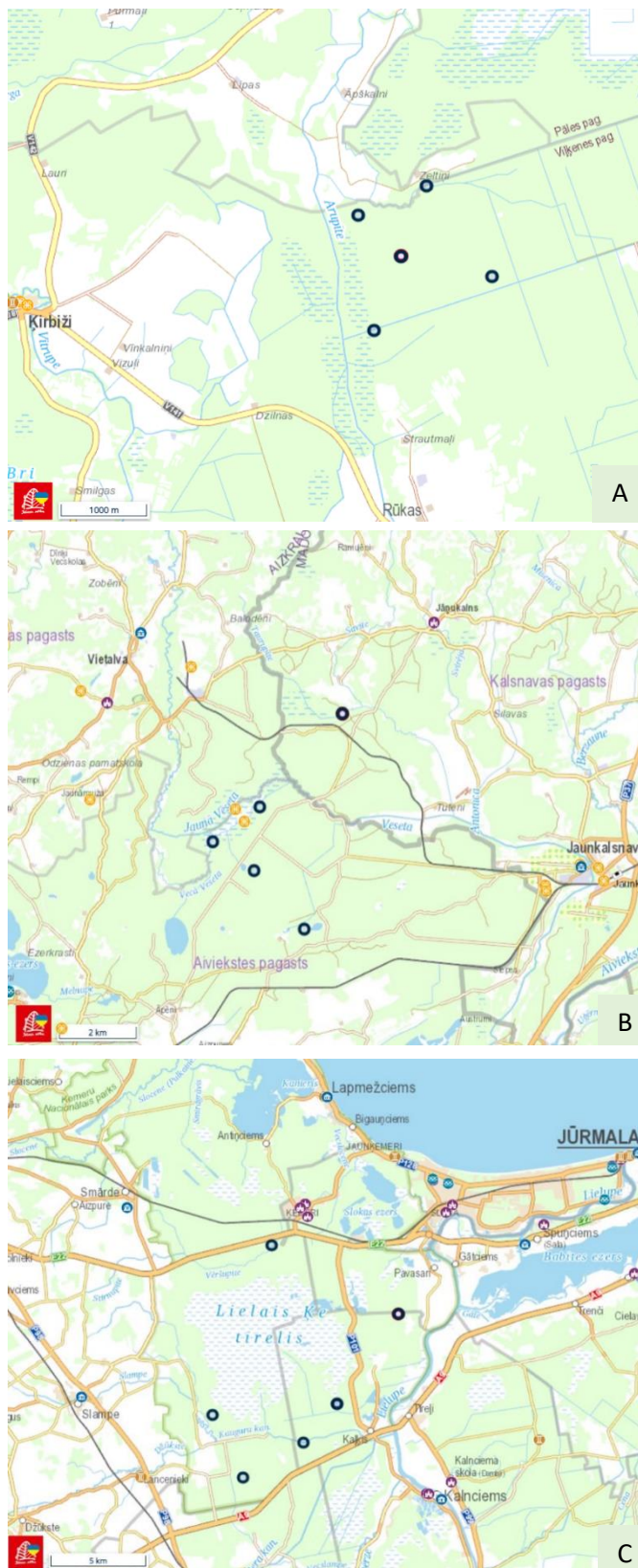
Pirms matu lamatu izvietojšanas tika veikta teritorijas apsekošana, matu lamatām izvēloties vietas, kur dzīvnieki iepriekš ir novēroti, kā arī vietas, kuras dzīvnieki potenciāli varētu izmantot (piemēram stigas, meža ceļi, takas gar ūdenstecēm). Citu valstu pētījumi sniedz informāciju, ka matu lamatas pētāmajā teritorijā var būt izvietotas pēc nejaušības principa, transektos vai arī vietās, kuras lūši apmeklē, lai atstātu teritorijas iezīmes. Protams, labākos rezultātus sniedz tās matu lamatas, kas izvietotas lūšiem specifiskās vietās (McDaniel et al. 2000, Schmidt and Kowalczyk 2006, Vogt et al. 2014, Allen et al. 2017, Krofel et al. 2017, Fležar et al. 2019, Hočevar et al. 2020).



1. attēls. 2020./2021. gada medību sezonā konstatētās lūšu pazīmes un nomedītie lūši (kartes avots: Valsts meža dienests).

Rozā kvadrāts – nomedīts, dzeltens – pazīmes, zaļš kvadrāts – nomedīts un pazīmes, svītrots kvadrāts – vairojas. Zaļais aplis – pētījuma vieta; 1 – Ķemeru nacionālais parks, 2 – Viļķene un 3 – Kalsnava.

Katrā parauglaukuma teritorijā izvietotas vismaz piecas **matu lamatas** (2., 3. attēls). ĶNP teritorijā izvietotas septiņas matu lamatas – vienā no izvēlētajām vietām netālu viena no otras izvietotas divas matu lamatas. Arī Kalsnavas teritorijā izvietotas septiņas matu lamatas, kur divās vietās netālu viena no otras izvietotas divas matu lamatas. Matu lamatu darbības pamatā apmatojuma (DNS saturošu) paraugu ieguvei izmanto lūšu paradumu berzēt galvu, kaklu vai sānus pie kāda vertikāla substrāta, noteiktās vietās apmeklējot un iezīmējot individuālo teritoriju. Līdz ar to arī matu lamatas izvietojuma augstums ir vismaz 60 cm virs zemes, jo lūši visbiežāk beržas ar galvas daļu. Pētījumu dati norāda, ka par labākām uzskatāmas pasīvās matu lamatas, kurās, dzīvniekam beržoties, izkrītošie mati paliek matu uztvērējā – dažāda “ķemmes tipa” modeļos (McDaniel et al. 2000, Schmidt and Kowalczyk 2006, Heurich et al. 2012, Hočevar et al. 2020).



2. attēls. Matu lamatu izvietojums trīs parauglaukumos – Viļķenē (A), Kalsnavā (B) un Ķemeru nacionālajā parkā (C).

Piezīme: attēlos izmantota karšu izdevniecības „Jāņa sēta“ sagatavotā digitālās kartes pamatne (balticmaps.eu)



3. attēls. Matu lamatas pētījuma teritorijās. Foto: G. Bagrađe.

Lai apmatojums, dzīvniekam beržoties, ieķertos un lamatas pārbaudes laikā varētu tikt ievākts, dotajā pētījumā izmantota dzīvnieku apmatojuma ķemmes spilventiņa daļa ar metāla sariņiem ar ieliektiem galiem. Starp ķemmes spilventiņu un koka stumbru ievietotas voiloka loksnes, kurās iepilina speciāli sagatavotu piesaistošu aromātu izdalošu vielu. Pētījuma norises laikā, ja izvēlēta matu lamatas vieta nebija egles stumbrs, sākotnējā matu lamata tika papildināta ar sausas egles mizas daļu, kurā

iestrādātas atverītes šķidrumsa ievākšanai (4. attēls), jo novērojot lūšus lamatā, kā arī ievācot paraugus, tika secināts, ka egles mizā ļoti labi saglabājas iekšērie mati.



4. attēls. Lūšu matu lamata papildināta ar egles mizas daļu. Foto: G. Bagrade.

Lai piesaistītu dzīvnieka uzmanību matu lamatai un veicinātu beršanās/glaušanās uzvedību, matu lamata tiek papildināta ar speciāli sagatavotu piesaistošu aromātu izdalošu vielu. Vairākos pētījumos (McDaniel et al. 2000, Schmidt and Kowalczyk 2006, Heurich et al. 2012), ir noskaidrots, ka vislielākais efekts ir bebru dziedzeru un kaķumētras tinktūras šķidrumsam. Lai novērtētu šķidrumsa efektivitāti, dotajā pētījumā dažās lamatu vietās tika uzstādītas divas ķemmītes, katru papildinot ar vienu no sagatavotajiem šķidrumsiem – bebru dziedzeru un baldriānu tinktūru un bebru dziedzeru un kaķumētras tinktūru (1. tabula). Matu lamatu pārbaude – matu lamatas papildināšana ar šķidrumsu – notika ne retāk kā 2x mēnesī, savukārt DNS saturošu paraugu ievākšanai – matu lamatas pārbaudi pielāgojot tuvākajā dienā pēc saņemta video/foto apstiprinājuma par dzīvnieka klātbūtni no slēpņu kameras. Šāda matu lamatu pārbaudes regularitāte (1x nedēļā vai 1x divās nedēļās) ir minēta arī citos pētījumos, uzsverot nozīmīgumu ievācamo paraugu kvalitātes nodrošināšanā tālākajām molekulārās ģenētikas analizēm (Hočevar et al. 2020).

Matu lamatu darbības laiks: no 2021. gada jūnija beigām/jūlija sākuma līdz 2022. gada martam, matu lamatām un slēpņu kamerām darbojoties 273 diennaktis Kalsnavā, 274 diennaktis Ķemeru nacionālajā parkā un 275 diennaktis Viļķenē.

1. tabula. Matu lamatās uzmanību piesaistošā šķidrums izmantošana.

Parauglaukums/matū lamata*	Bebru dziedzeru un baldriānu tinktūra	Bebru dziedzeru un kaķumētras tinktūra
Vilķene		
9 kamera	x	
10 kamera	x	x
11 kamera	x	
12 kamera	x	
13 kamera	x	x
Kalsnava		
19 kamera	x	x
20 kamera	x	x
21 kamera		x
22 kamera	x	
23 kamera		x
24 kamera	x	
25 kamera		x
Ķemeru nacionālais parks		
1 kamera		x
2 kamera		x
15 kamera	x	x
16 kamera	x	x
17 kamera	x	x
18 kamera	x	x
14 kamera	x	x

* - kameru numuri izmantoti rezultātu šķirošanas vajadzībām

Sugas nepārprotamu pierādījumu iegūšanai Eiropā plaši tiek izmantotas arī **slēpņa kameras**. Tajās fiksēto materiālu var izmantot gan gadījuma novērojumu apzināšanai, gan sistemātiskai vietu uzraudzībai. Slēpņa kameru priekšrocības izpaužas, ja populācijā ir lūši ar individuālām pazīmēm. Šādu indivīdu atkārtota fiksācija ļauj aprēķināt populācijas blīvumu konkrētajā vietā. Slēpņa kameras dati dod papildus iespēju salīdzināt un vērtēt fiksēto indivīdu ārējo un genotipēto pazīmju unikālo sakritību vai neatbilstību (Hočevar et al. 2020).

Lai novērotu lūšu rīcību matu lamatā, katrā matu lamatas vietā izvietota slēpņa kamera (5. attēls). Pētījumā izmantotas *Uovision* un *Browning* kameras (2. tabula). Katrā matu lamatas vietā tika uzstādīta *Uovision* slēpņa kamera un trijās matu lamatu vietās katrā no pētījuma teritorijām, tika izmantota arī *Browning* slēpņa kamera. Kameru apkope – bateriju/akumulātoru maiņa, video/foto materiāla ievākšana – notiek ne retāk kā 2x mēnesī, līdz ar matu lamatu regulāro pārbaudi.



5. attēls. Matu lamata un slēpņa kamera. Foto: G. Bagrade.

2. tabula. Lūšu matu lamatās izmantoto slēpņa kameru tehniskie parametri.

Kameras nosaukums un parametri	Uovision 4G GLORY LTE (Model No. L4-E)	BROWNING Spec Ops Elite HP4 (Model BTC-8E-HP4)
Raidīšanas režīms	<u>Raidošā</u> Piesaistīta 4G mobilajam tīklam ar iespēju skatīt ierakstītos datus gan pēc noraidīšanas speciālā datoraplikācijā, gan SD kartē	<u>Neraidošā</u> Datu ieraksts SD kartē
Naktī izmantotā izgaismošana	Dzīvniekiem un cilvēkam neredzama	Dzīvniekiem un cilvēkam neredzama
Aptuvenais uztveršanas un izgaismošanas attālums	20 m	18 m līdz 24 m
Darbības režīms	Video ar skaņas ierakstu	Video ar skaņas ierakstu/foto (turpmāk iekavās fotorežīma parametri)

Sensora reakcijas ātrums	0,6 sek	0,4 sek/(0,1sek)
Faila garums	10 sek	30 sek (naktī 20sek) / (nepārtraukti 4 foto)
Gatavības laiks nākamajai video /foto sērijai	5 sek Failu raidīšanas brīdī – 40 sek līdz 1,5 min (atkarībā no mobila signāla stipruma)	1 sek
Izķiršanas spēja	Full HD 1920×1080 (1080p) 30 kadri sek	ULTRA Full HD 1920x1080 (1080p) 60kadri sek /(ULTRA 22Mix)
Kvalitāte dienā/ naktī	Krāsains/ melnbalts	Krāsains/ melnbalts
Strāvas avots	12 (1,2V 2700mAh) zemas pašizlādes NiMH pirkstiņbaterijas (iestatījumu uzstādīšanai), un 6 V (12Ah) svina skābes akumulators (pamatdarbībai un mobilo sakaru nodrošināšanai)	8 (1,2V 2700mAh) zemas pašizlādes NiMH pirkstiņbaterijas

1.2. Paraugu apstrāde

DNS izdalīšana no neinvazīvā ceļā iegūto lūšu paraugiem (matiem, ekskrementiem, urīna, pēdas nospiedumiem sniegā un dubļos).

DNS izdalīta no urīna un pēdas nospiedumiem sniegā, kā arī no pakaišiem, izmantojot metodes, kuras izstrādātas DNS izdalīšanai no ūdens (Carim et al. 2016, Tsuji et al. 2019). Šīs metodes izmantotas lielo plēsēju DNS izdalīšanai no sniega paraugiem (Franklin et al. 2019). DNS izdalīta no matu un ekskrementa paraugiem izmantojot metodes, kuras aprobētas DNS izdalīšanai no neinvazīvā ceļā ievāktiem lāču matu un ekskrementu paraugiem (Bojārs et al. 2019).

Matu, urīna un pēdas nospiedumu paraugi, kā arī pakaiši ar matiem izdalīti izmantojot QIAamp® DNA Micro kit (Qiagen) pēc protokola genomiskās DNS izdalīšanas no audiem (matu, pēdas nospiedumi un daļa urīna paraugu) vai pēc protokola genomiskās DNS izdalīšanai no urīna (daļa urīna paraugu).

DNS no matiem izdalīta paņemot nelielu matu kušķi vai atsevišķus matus (1-10 gab., atkarībā no tā, cik daudz mati bija pieejami), izmantojot protokolu genomiskās DNS izdalīšanai no audiem lizēšanas solī, papildus pie 180 µl ATL bufera un 20 µl proteīnāzes K pievienojot 20 µl 1 M

ditiotreitola (DTT). Paraugi inkubēti termoblokā – kratītājā 2-4 h, un DNS izdalīta, kā aprakstīts protokolā.

DNS izdalīšanai no urīna paraugiem izmantoja vates kociņus/irbulišus ar urīna uztriepi, koka mizu ar urīnu vai urīnu sniegā. Metodes pielāgošanai DNS izdalīta atšķirīgi. Vates kociņš ar urīna uztriepi un koka miza ar urīnu izdalīta pēc protokola genomiskās DNS izdalīšanai no audiem. Abus parauga veidus ievietoja 2 ml stobriņā ar 180 µl ATL bufera un 20 µl proteināzes K, pievienojot 20 µl 1 M ditiotreitola (DTT), un inkubēja termoblokā – kratītājā 2-4 h. DNS izdalīta kā aprakstīts protokolā.

Urīna paraugs sniegā izdalīts divejādi – daļu paraugu dalīja pēc genomiskās DNS izdalīšanas protokola no urīna, bet otru daļu – ar vakuuma palīdzību, izmantojot 0.20 µm filtru un 20 ml medicīnisko šļirci bez adatas (1. un 2. attēls). Kad urīna paraugs izfiltrēts caur filtru, tas tika ievietots 2 ml stobriņā un pievienoja 180 µl ATL bufera, 20 µl proteināzes K un 20 µl 1 M ditiotreitola (DTT) un inkubēja termoblokā – kratītājā 2-4 h. DNS izdalīta, kā aprakstīts protokolā genomiskās DNS izdalīšanai no audiem.

DNS no pakaišiem izdalīja trīs dažādos veidos: pakaišiem pielejot 50 ml destilēta ūdens, paraugu kārtīgi sakratot un DNS izdalot pēc urīna protokola vai arī centrifugējot paraugus 5 min. pie 8 000 rpm un filtrējot caur 0.2 µm filtru un 20 ml medicīnisko šļirci bez adatas vai caur filtrpapīru, kas novietota uz Bihnera piltuves un Bundzena kolbas (3. attēls). Gan filtrs, gan filtrpapīrs ievietots 2 ml ependorfā ar 180 µl ATL bufera un 20 µl proteināzes K pievienojot 20 µl 1 M ditiotreitola (DTT) un inkubēja termoblokā – kratītājā 2-4 h, un DNS izdalīta, kā aprakstīts pēc genomiskās DNS izdalīšanas no audiem protokola.

DNS no pēdas nospiedumiem sniegā izdalīja pēc genomiskās DNS izdalīšanas protokola no audiem ar vakuuma palīdzību, izmantojot 0.20 µm filtru un 20 ml medicīnisko šļirci bez adatas vai caur filtrpapīru, kas novietota uz Bihnera piltuves un Bundzena kolbas (6., 7., 8. attēls). Gan filtra saturošais slānis, gan filtrpapīrs ievietots 2 ml ependorfā ar 180 µl ATL bufera un 20 µl proteināzes K, pievienojot 20 µl 1 M ditiotreitola (DTT) un inkubēja termoblokā – kratītājā 2-4 h, un DNS izdalīta, kā aprakstīts pēc genomiskās DNS izdalīšanas protokola no audiem.

DNS no pēdas nospiedumiem dubļos (vates kociņš ar uztriepi) izdalīta tāpat, kā urīna uztriepes paraugs.

Ekskremeti izdalīti izmantojot E.Z.N.A.® Stool DNA Kit (Omega Bio-tek) un DNS izdalīšanas protokolu no lieliem audu daudzumiem (14. - 18 lpp). Izdalīšanai ņemti apm. 500 mg ekskrementu.

Visi izdalītie DNS paraugi eluēti divreiz pievienojot 40 µl TE bufera (gala tilpums – 80 µl).



6. attēls. 0.20 µm filtri un filtrējamie paraugi – pēdas nospiedumi sniegā. Foto: B. Krivmane.



7. attēls. DNS saturoša parauga filtrēšana, izmantojot 0.20 µm filtru un 20 ml medicīnisko šļirci bez adatas. Foto: V. Lazdiņa.



8. attēls. DNS saturoša parauga filtrēšana, izmantojot filtrpapīru, Bihnera piltuvi un Bundzena kolbu.
Foto: B. Krivmane.

Polimerāzes ķēdes reakcija

Polimerāzes ķēdes reakciju (PCR) sākotnēji veica pēc laboratorijā jau iepriekš pārbaudītas un atstrādātas metodikas – veicot PCR tāpat kā no iepriekšējo gadu medību sezonās nomedītajiem lūšu paraugu izdalītajiem DNS, izmantojot 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix ar 10 mM MgCl₂, 0.3 μM forward (F) un reverse (R) praimerus. Metodikas izstrādei priekš PCR produktu amplifikācijas izmēģināti un izmantoti sekojoši mikrosatelītu marķeiri: Fca001, Fca026, Fca043, Fca045, FCA082, Fca123, LC110, Fca126, Fca723, Fca725, Fca293, Fca567 (Menotti-Raymond et al. 1999, 2005). PCR reakcijas gala tilpums - 10 μl. Katram paraugam PCR reakcija veikta ar 3 tehniskiem atkārtojumiem un 3-5 dažādiem praimeru komplektiem. PCR veikta sekojošā režīmā: sākotnējā denaturācija 95 °C 15 min, 29 cikli 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, un beigu elongācija 72 °C 45 min. Diemžēl pielietotie reaģenti un režīms nebija veiksmīgs, pat pēc vairākkārtēja PCR režīma pielāgošanas, lai sekmīgi amplificētu PCR produktus.

Tomēr, veicot PCR ar 5x HOT FIREPol® MultiPlex Mix ar 10 mM MgCl₂ pie dažādiem PCR apstākļiem, izdevās iegūt PCR produktus. Vislabākos rezultātus novēroja, veicot PCR reakciju ar 2 μl 5x HOT FIREPol® MultiPlex Mix (Solis BioDyne) (saturušu 10 mM MgCl₂), 0.3 μM forward (F) un reverse (R) praimeriem. Metodikas izstrādei priekš PCR produktu amplifikācijas izmēģināti un izmantoti iepriekš tekstā minētie mikrosatelītu forward un reverse praimeru komplekti. PCR reakcijas gala tilpums – 10 μl. Katram paraugam PCR reakcija veikta ar 3 tehniskiem atkārtojumiem un 3-5 dažādiem praimeru komplektiem.

Reakcijas maisījums 1 paraugam ar 1. praimeru komplektu:

5x HOT FIREPol® MultiPlex Mix ar 10 mM MgCl₂ – 2 µl

10 mM praimeris Fca001 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca001 R – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca043 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca043 R – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca045 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca045 R – 0,5 µl

DNS – 2-5 µl (ekskrementi, mati – 2 µl, pēdas nospiedumi – 5 µl)

H₂O – līdz 10 µl reakcijas gala tilpumam

Reakcijas maisījums 1 paraugam ar 2. praimeru komplektu:

5x HOT FIREPol® MultiPlex Mix ar 10 mM MgCl₂ – 2 µl

10 mM praimeris Fca126 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca126 R – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca723 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca723 R – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca725 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca725 R – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca293 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca293 R – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca567 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca567 R – 0,5 µl

DNS – 2-5 µl (ekskrementi, mati – 2 µl, pēdas nospiedumi – 5 µl)

H₂O – līdz 10 µl reakcijas gala tilpumam

Reakcijas maisījums 1 paraugam ar 3. praimeru komplektu:

5x HOT FIREPol® MultiPlex Mix ar 10 mM MgCl₂ – 2 µl

10 mM praimeris Fca082 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca082 R – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca026 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca026 R – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca123 F – 0,5 µl

10 mM praimeris Fca123 R – 0,5 µl

10 mM praimeris LC110 F – 0,5 µl

10 mM praimeris LC110 R – 0,5 µl

DNS – 2-5 µl (ekskrementi, mati – 2 µl, pēdas nospiedumi – 5 µl)

H₂O – līdz 10 µl reakcijas gala tilpumam

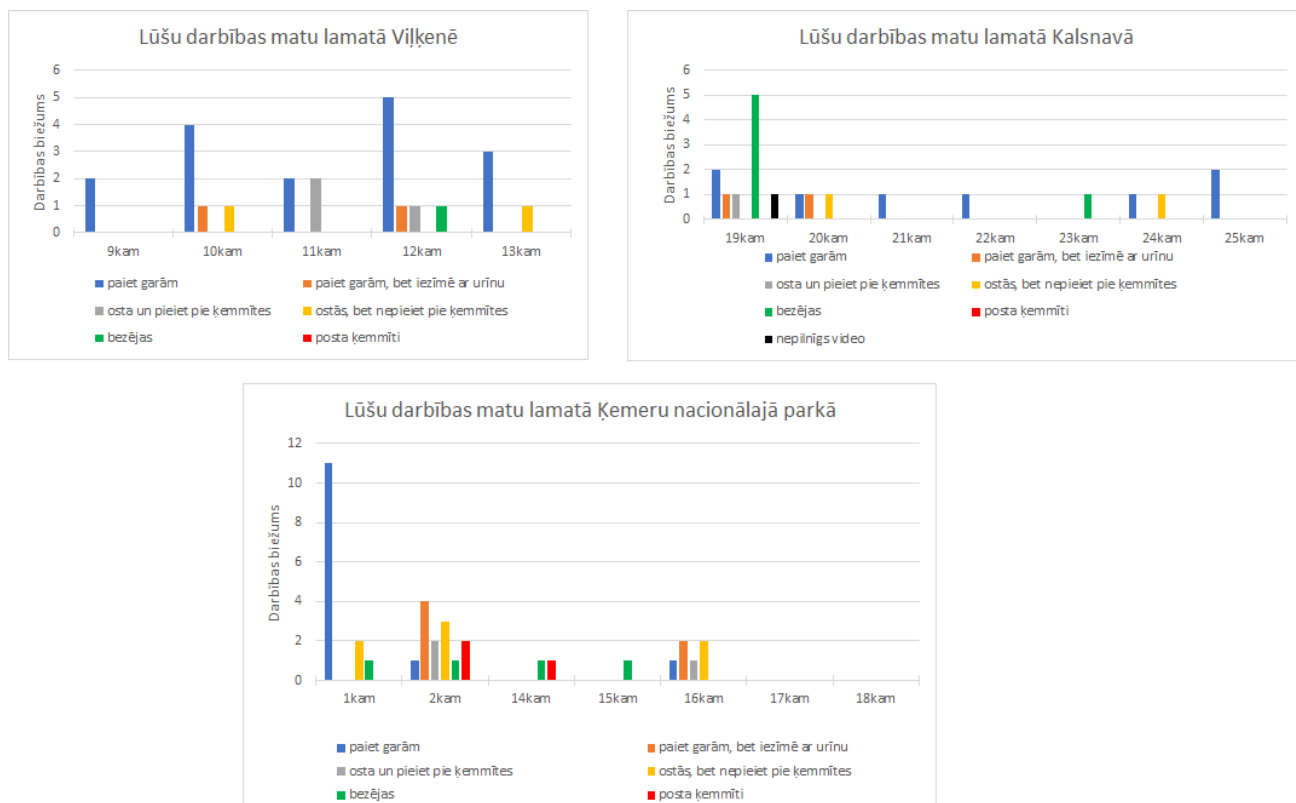
PCR veikta sekojošā režīmā: sākotnējā denaturācija 95 °C 12 min, 45 cikli 95 °C 30 s, 57 °C 1 min, 72 °C 3 min, un beigu elongācija 72 °C 45 min.

PCR produkti atšķaidīti ar dejonizētu ūdeni attiecībā 1 : 5 (DNS paraugiem no pēdas nospiedumiem) vai 1:10 (ekskrementi, mati). 1 ml atšķaidīta PCR produkta pārņemts jaunā platē, kurā iepriekš pievienots 11 ml Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) un 0.05 ml paštaisīta ROX saturoša kalibrācijas standarta. PCR produkti vizualizēti uz Applied Biosystems ABI Prism 3100xl ģenētiskā analizatora. Iegūtie rezultāti analizēti izmantojot GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) datorprogrammu.

2. Iegūto datu novērtējums

Matu lamatu un slēpņa kameru datu rezultāti

Novērojot lūšu darbības matu lamatās, jāsecina, ka lūši galvenokārt uzmanību velta matu lamatai, kura bagātināta ar bebru dziedzeru un kaķumētras tinktūru. Lūšu darbības matu lamatā var vērtēt no pilnīgi neitrālas reakcijas – lūsis paiet matu lamatai garām, līdz aktīvai matu lamatas izmantošanai – berzēšanās un pat matu lamatas ķemmītes postīšanai – plēšanai un košanai (9., 10 attēls).



9. attēls. Lūšu darbības un to novērotais biežums matu lamatās trijos parauglaukumos.



10. attēls. Lūša plēsta matu lamata. Foto: A. Ornicāns.

Pirmais lūšu novērojums Viļķenē izvietotajās matu lamatās bija drīz pēc matu lamatas izvietojuma – 01.07.2021. Matu lamatu darbības laikā (matu lamata darbojās 275 diennaktis) lūši tika novēroti 24 reizes, un novērojumi bija no visām matu lamatu vietām. Ievākto paraugu veidi un skaits redzams 3. tabulā. Minimālā lūšu skaita vērtējums teritorijā (poligona laukums starp matu lamatu izvietojuma punktiem – 1,66 km²) – divi pieauguši dzīvnieki. Vērtējot slēpņa kameru datus, redzams viens izteikti plankumains lūsis, kurš vēl ir ticis novērots Viļķenes pagasta teritorijā izvietotajā lāču matu lamatā (11. attēls). Bez lūšiem teritorijā novērotas 17 zīdītāju sugas (skat. 1. pielikumu).



11. attēls. Viļķenes pagasta teritorijā izvietotajās matu lamatās (A – lūšu matu lamata, B – lāču matu lamata) identificētais lūsis ar individuālajām fenotipiskajām pazīmēm.

Pirmais lūšu novērojums Kalsnavā izvietotajās matu lamatās bija 17.07.2021., kad tika novērota lūšu mātīte ar diviem lūsēniem. Savukārt 06.12.2021. citā matu lamatas kamerā novērota lūsene ar trijiem pusaugu lūsēniem. Visticamākais tā ir viena un tā pati lūšu ģimene, kurai vasaras

periodā trešo lūsēnu neizdevās nofilmēt. Pie tam, vienas matu lamatas video ar lūšu ģimeni pieejams vasaras periodā, savukārt otras matu lamatas video materiāli, vairākkārtēji ilgākā laika periodā – ziemas periodā. Matu lamatu darbības laikā (matu lamata darbojās 273 diennaktis) lūši tika novēroti 20 reizes, un novērojumi bija no visām matu lamatu vietām. Ievākto paraugu veidi un skaits redzams 3. tabulā. Vērtējot slēpņu kameras datus, var secināt, ka matu lamatu teritoriju (poligona laukums starp matu lamatu izvietojuma punktiem – 6,95 km²) šķērso vismaz trīs pieauguši tēviņi, no kuriem viens ir ar izteiktu ķermeņa apmatojuma plankumainību, un viena lūšu ģimenes grupa. Vērtējot video materiālu, pēc fenotipiskajām pazīmēm ir identificēts viens lūsis, kuram raksturīga nošķiebta aste un ausu pušķītis (12. attēls). Šis lūsis novērots vairākkārt divās matu lamatās. Bez lūšiem teritorijā novērotas 14 zīdītāju sugas (skat. 2. pielikumu). Esošo matu lamatu izvietojuma teritorija arī 2004.-2009. gadā bija veiksmīga lūšu aprīkošanai un izsekošanai ar radio/satelīta raidītājiem telemetrijas mērķiem (Ozoliņš et al. 2017).



12. attēls. Kalsnavas teritorijā identificēts lūsis ar individuālajām fenotipiskajām pazīmēm – uz labo pusi sašķiebtu asti un noliektu kreisās auss pušķīti.

Pirmais lūšu novērojums ĶNP izvietotajās matu lamatās bija 07.06.2021. Matu lamatu darbības laikā (matu lamata darbojās 274 diennaktis) lūši tika novēroti 36 reizes piecās no septiņām matu lamatu vietām. Ievākto paraugu veidi un skaits redzams 3. tabulā. Novērojumi liecina, ka teritorijā (poligona laukums starp matu lamatu izvietojuma punktiem – 67,5 km²) uzturas lūšu mātīte ar diviem lūsēniem, kā arī divi lūšu tēviņi, no kuriem viens ir izteikti plankumains (13. attēls). Bez lūšiem teritorijā novērotas 14 zīdītāju sugas (skat. 3. pielikumu).



13. attēls. Ķemeru nacionālā parka teritorijā identificēts lūsis ar individuālajām fenotipiskajām pazīmēm.

Pētījuma parauglaukumos izvēlēto matu lamatu izvietojums ir bijis veiksmīgs, jo lūsis ir novērots katrā matu lamatas vietā, izņemot ĶNP, kur lūša novērojumi ir piecās no septiņām matu lamatām. Līdzīgi citu valstu pieredzei, lūšu aktivitāte matu lamatās nav augsta, ja tā nav izvēlēta lūšim specifiskās vietās (Schmidt and Kowalczyk 2006, Hočevar et al. 2020). Dotajā pētījumā, katrā teritorijā bija vismaz viena matu lamata izvietota lūšu teritorijas apsekošanas un iezīmēšanas vietā – šajās lamatās vairākkārt novēroti lūši gan darbībā, gan ejot garām.

Tiek uzskatīts, ka visefektīvāk matu lamatas darbojas ziemas periodā, kas saistīts ar pastiprinātu dzīvnieku aktivitāti riesta laika (pārvietošanās lielākās teritorijās, aktīvāka teritoriju iezīmju atstāšana), kā arī to, ka ziemas laikā dzīvnieka kažoks ir biežāks un ar garākiem matiem (Schmidt and Kowalczyk 2006, Heurich et al. 2012). Dotajā pētījumā lūšu aktivitāte, lai arī neregulāra, tika novērota visā pētījuma norises laikā un, apstiprinot iepriekšminēto pētījumu novērojumus – intensīvāk ziemas periodā.

Video materiāls no slēpņa kamerām par trijās pētījuma vietās novērotajiem lūšiem un to darbībām matu lamatās ir apskatāms LVMI “Silava” mājas lapā – <http://www.silava.lv/24/section.aspx/View/293>.

Neinvazīvā ceļā ievāktie paraugi un to ģenētisko analīžu rezultāti

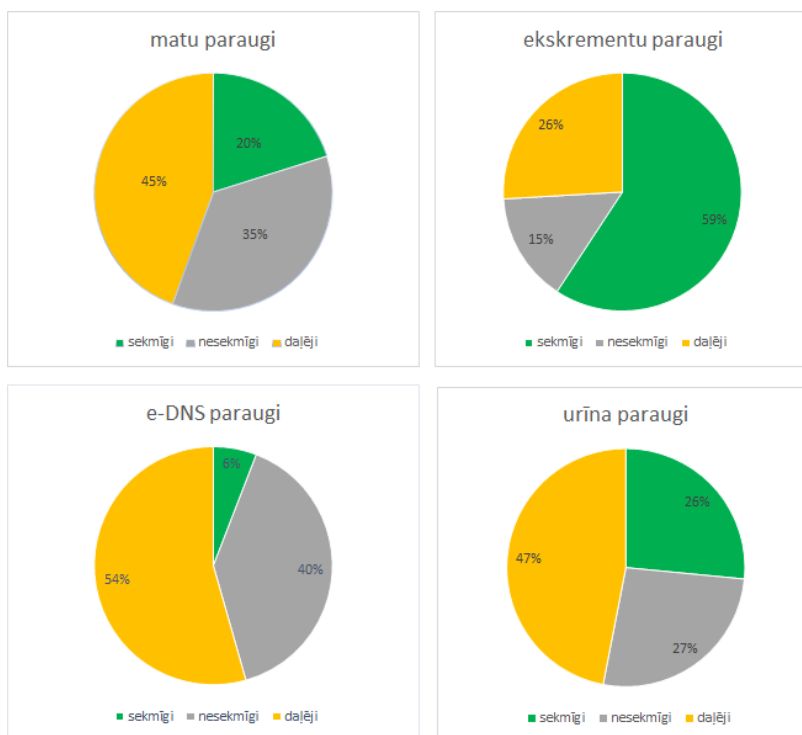
Pētījuma norises laikā neinvazīvā ceļā ievākti sekojoši paraugi: matu, urīna, ekskrementu un svaigu pēdu nospiedumu sniegā un dubļos (e-DNS) paraugi (3. tabula). Paraugu apstrādes un DNS izdalīšanas protokolu pielāgošanas nolūkā matu un urīna paraugi ievākti arī no dažiem 2020./21.gada medību sezonā legāli nomedītajiem lūšiem, kā arī ceļu satiksmes negadījumos cietušiem lūšiem.

3. tabula. Pētījuma laikā ievāktie paraugu veidi.

	Mati*	Urīns	Ekskrementi	e-DNS
Savvaļa				
Matu lamatas Viļķenē	11	1		11
Matu lamatas Kalsnavā	17	4		10
Matu lamatas Ķemeru nacionālajā parkā	27	4	1	19
Nebrīve				
Līgatnes Dabas takas	4	6	9	6
Rīgas Nacionālais zooloģiskais dārzs	40	24	46	11
Cits**	26	8		3

* - matu paraugu grupa apvienota ar paraugu grupu "pakaiši". ** - paraugi, kas ievākti no 2020./21.gada medību sezonā legāli nomedītajiem lūšiem, ceļu satiksmes negadījumā bojā gājušiem lūšiem un ārpus pētījuma teritorijā veiktu pēdu apsekojuma maršrutos.

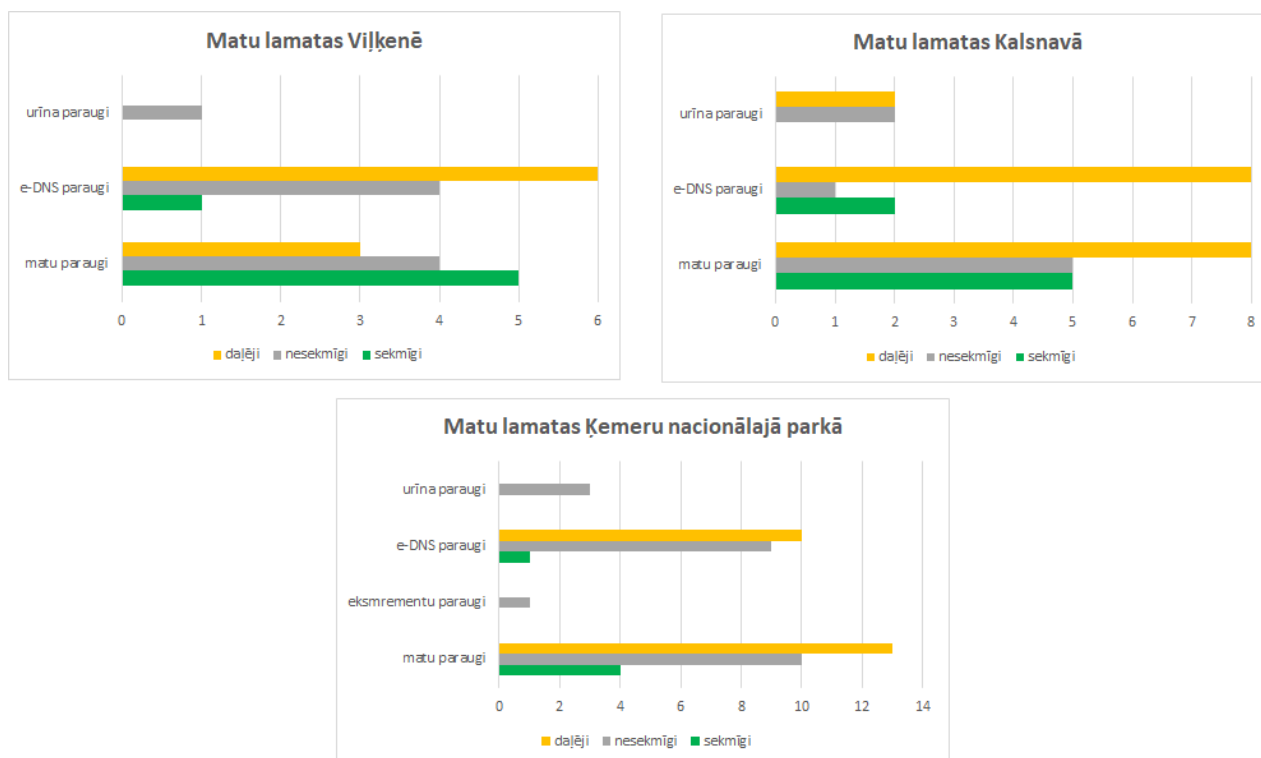
Vislabākie rezultāti – augstas kvalitātes izdalīta DNS – ir iegūti no ekskrementu paraugiem, pēc tam sekojot urīna un matu paraugiem un viszemākie rezultāti ir apstrādājot pēdu nospiedumu sniegā un dubļos paraugus. Ievāktu paraugu ģenētisko analīžu sekmība redzama 14. attēlā. Augstas kvalitātes izdalītās DNS īpatsvars no ekskrementu paraugiem ir iegūts arī veicot *Lāču monitoringu 2020.-2022.gadam* (LVMI "Silava" 2021). Ekskrementa paraugi satur salīdzinoši daudz DNS saturošu materiālu, bet no matu paraugiem ir iespējams izdalīt DNS tikai, ja tie satur matu saknītes. Paraugus, kuri tika ievākti kopā ar sniegu (urīns un pēdas nospiedumi), ir iespējams nofiltrēt un tādā veidā sakoncentrēt DNS saturošo materiālu. Uztriepes veikšanā ar vates kociņiem ir mazāka iespēja ievākt DNS saturošu materiālu. Papildus faktors, kas ietekmē sekmīgu rezultātu iegūšanu, ir paraugu svaigums un vides apstākļi ievākšanas vietā (temperatūra, saules apstarojums u.c.). Iespējams, ka paraugi, kuri ievākti no nebrīvē mītošajiem lūšiem, ir ātrāk savākti, salīdzinot ar savvaļas paraugiem. Cits faktors, kas varētu ietekmēt rezultātus, ir iespēja, ka vienā paraugā ievāc DNS saturošu materiālu no dažādiem lūšu indivīdiem, kas varētu komplicēt tālāko analīzi un indivīda identifikāciju.



14. attēls. Pētījuma laikā ievākto paraugu ģenētisko analīžu sekmība.

Zaļš – sekmīgs rezultāts (rezultāti ar 6-8 marķieriem), dzeltens – daļēji sekmīgs rezultāts (rezultāts ar 2-5 marķieriem), pelēks – nesekmīgs rezultāts (rezultāti ar 0-1 marķierim).

Vērtējot ievākto paraugu rezultātus no matu lamatu teritorijām, labākus rezultātus uzrādīja matu paraugi (15. attēls). Turpinot šādus pētījumus, lai, iespējams, matu paraugu rezultātu sekmība būtu augstāka, matu paraugus vispirms pārbaudīt uz sugas piederību un tad turpināt genotipēšanu. Slēpņa kameru datos ir redzams, ka bez lūša par matu lamatām interesi vēl ir izrādījušas arī citas zīdītāju sugas, piemēram, lapsa, jenotsuns un āpsis. No pētījumu vietām ievākts tikai viens ekskrementa paraugs, kas saistīts ar kaķu dzimtas dzīvnieku paradumu aprakt savus ekskrementus, līdz ar to apgrūtinot to atrašanu. Urīna paraugus matu lamatās ir salīdzinoši grūti ievākt, jo pēc video faila apskates no iespējamās vietas uz koka stumbra ar vates kociņu tika noņemta uztriepe vai arī veikts mizas nokasījums, kas ne vienmēr garantē materiāla ievākšanu.



15. attēls. Matu lamatu teritorijās ievāktu paraugu ģenētisko analīžu sekmība.

Zaļš – sekmīgs rezultāts (rezultāts ar 6-8 marķieriem), dzeltens – daļēji sekmīgs rezultāts (rezultāts ar 2-5 marķieriem), pelēks – nesekmīgs rezultāts (rezultāts ar 0-1 marķieri).

Viļķenes teritorijā noteikti genotipi dieviem lūšiem. Vienu genotipu izdevās izdalīt no matu paraugiem, kas ievākti no trijām matu lamatām dažādos datumos (jūlijā, novembrī, janvārī, februārī un martā). Vērtējot video materiālu ar šo lūsi, lielākā daļa no tiem ir uzņemti krēslas laikā un tikai divi video ir dienas gaišajā daļā. Konkrētais indivīds ir mazplankumains, plankumiem galvenokārt koncentrējoties uz ekstremitātēm, it īpaši ekstremitāšu iekšpusi, pie tam katrā no video dzīvnieks ir redzams no cita sāna (16. attēls). Otru genotipu sekmīgi izdalīja (7 no 8 marķieriem) no pēdas nospieduma parauga, kas ievākts, veicot teritorijas apsekojumu.



16. attēls. Lūsis matu lamatā Viļķenes teritorijā.

Kalsnavas teritorijā noteikti trīs dažādi lūšu genotipi, visi noteikti, analizējot matu paraugus. Divi lūšu genotipi noteikti no matu paraugiem, kas ievākti dažādos datumos (janvāris, februāris un marts) vienā matu lamatā. Vēl divu lūšu genotipi sekmīgi izdalīti (6 no 8 marķieriem) no e-DNS paraugiem. Kalsnavas teritorijā vienu no matu lamatām regulāri apmeklēja gan lūšu ģimene (mātīte ar trijiem lūsēniem), gan arī vismaz viens individuāls lūsis (tēviņš). Šīs matu lamatas paraugiem nepieciešamas papildus analīzes – gan dzimuma noteikšanai, gan arī iespējamās radniecības noteikšanā.

Ķemeru nacionālā parka teritorijā noteikti trīs dažādu lūšu genotipi – divi genotipi no matu paraugiem un viens – no pēdu nospiedumu paraugiem. Iespējams ir vēl ceturtais lūša genotips, kas iegūts no pēdu nospieduma paraugiem, bet šo paraugu izdalītās DNS kvalitātes sekmība ir daļēja. Viena lūša genotips ir noteikts no matu paraugiem, kas ievākti augustā un novembrī trijās matu lamatās. Otra lūša genotips, kas noteikts no matu paraugiem, ievākti augustā un janvārī divās matu lamatās. Līdzīgi kā Kalsnavas teritorijā, arī ĶNP teritorijā ir viena matu lamatas vieta, kuru lūši apmeklēja vairākkārtīgi – šajā matu lamatā ievāktu paraugu analīze sniedz datus par trijiem lūšu genotipiem. Slēpņu kameras datus ir redzami vienas ģimenes grupas lūši, līdz ar to šīs matu lamatas paraugus nepieciešams papildus analizēt, lai datiem būtu lielāka izšķirtspēja radniecības noteikšanā.

Dotais pētījums Latvijā tiek veikts pirmo reizi. Var secināt, ka ir iespējams veikt ģenētiski identificētu indivīdu sasaisti ar slēpņu kamerās fiksēto indivīdu fenotipiskajām pazīmēm, kā arī dažādās teritorijās izvietotajās slēpņu kamerās identificēt vienu un to pašu indivīdu. Taču secinājumus par metožu efektivitāti ir vēl pārāgri sniegt, jo pētījums noritēja tikai nepilnu gadu un būtu nepieciešams turpināt sistemātiski ievākt datus, palielinot datu kopu.

No paraugiem, kas ievākti no lūšiem nebrīvē – Līgatnes dabas takās un Rīgas Nacionālajā zooloģiskajā dārzā un tā filiālē, vissekmīgāk izdalīti ekskrementu paraugi (17. attēls). Līgatnes dabas takās dzīvo pieci lūši – tēviņš un mātīte, un to viena metiena trīs pēcnācēji (Līgatnes dabas taku dati). Pārlicinoši ģenētiski identificēt izdevās trīs dažādu lūšu genotipus. Daļēji sekmīgu paraugu papildanalīzes, iespējams, sniegtu informāciju par ceturtais lūša genotipu. Divu lūšu genotipus izdevās identificēt no urīna paraugiem, savukārt viena lūša genotipu – no diviem dažādiem ekskrementu paraugiem. Rīgas Nacionālajā zooloģiskajā dārzā mitinās četri lūši – divi lūši – tēviņš un mātīte – zoodārzā ir nonākuši no savvaļas, savukārt divi pārējie lūši ir abu iepriekšminēto lūšu pēcnācēji. Rīgas Nacionālā zoodārza filiālē mitinās trīs lūši – viena mātīte, kas zoodārzā nonākusi no savvaļas un divi lūši – mātīte un tēviņš, kas ir savstarpēji radnieciski (Rīgas Nacionālā Zooloģiskā dārza dati). No Rīgas Nacionālā zooloģiskā dārzā ievāktiem paraugiem izdevās identificēt divus genotipus – viens genotips identificēts no ekskrementu, matu un urīna paraugiem, bet otrs – no ekskrementu, matu un

pēdu nospiedumu paraugiem. Zoodārza filiāles paraugu analīze sniedz datus par divu lūšu genotipiem, no kuriem viens iegūts no urīna, savukārt otrs – no ekskrementa paraugiem.



17. attēls. Paraugu, kas ievākti no lūšiem nebrīvē, ģenētisko analīžu sekmība.

Zaļš – sekmīgs rezultāts (rezultāts ar 6-8 marķieriem), dzeltens – daļēji sekmīgs rezultāts (rezultāts ar 2-5 marķieriem), pelēks – nesekmīgs rezultāts (rezultāts ar 0-1 marķieri).

Viens no pētījuma mērķiem bija izstrādāt protokolus sekmīgai DNS izdalīšanai no dažādiem neinvazīvā ceļā ievāktiem lūšu paraugiem – t.sk. pēdas nospiedumi un urīna paraugi sniegā, uztriepes, ekskrementi, matu paraugi. DNS izdalīšanas veiksmē tika pārbaudīta ar ierobežotu marķieru skaitu (dotajā pētījumā – 8 marķieri), jo mērķis bija pārbaudīt DNS izdalīšanas sekmīgumu. Turpmākajos pētījumos papildus marķieru izmantošana dos augstāku izšķirtspēju un ticamību indivīdu identifikācijai. Tas ir īpaši būtiski, ja tiek ievākti paraugi no radniecīgiem indivīdiem (kā, piemēram – nebrīvē esošie lūši vai savvaļā vienas ģimenes grupas dzīvnieki), jo tad ir nepieciešams lielāks marķieru skaits, lai precīzi identificētu indivīdus, un noteikt to radniecības pakāpi.

3. Secinājumi

- Katrā pētījuma teritorijā vērtējais dzīvnieku skaits ir 2-3 individuālie dzīvnieki (ģimeņu grupā tiek skaitīta tikai mātīte). Ņemot vērā pētījuma norises ilgumu, attālumus starp teritoriju vietām, kā arī līdzšinējos telemetrijas datus, uzskatāms, ka starp šīm trim teritorijām lūšu sastopamība un izplatība nepārklājas un kopumā pētījuma laikā identificēti vismaz deviņi pieauguši indivīdi un tajā skaitā vismaz divas reproduktīvas mātītes.
- Dotā brīdī pētījuma rezultātus par katrā teritorijā vērtēto dzīvnieku skaitu un, izejot no tā, dzīvnieku blīvumu nevar ekstrapolēt uz lielāku teritoriju. Ir nepieciešami sistemātiski ievākt datus ilgākā laika periodā un lielākā platībā, nodrošinot lielāku datu kopu.
- Matu lamatas ir nozīmīga metode neinvazīvā ceļā DNS saturošu paraugu ieguvei. Turpmāk matu lamatas būtu iekļaujamas lūšu neinvazīvā monitoringa shēmā, īpaši apvienojot tās darbību ar citām datu neinvazīvām ieguves metodēm, piemēram slēpņu kamerām.
- Matu lamatu izvietojuma modelis teritorijā jāizvēlas atbilstoši vēlamajam monitoringa mērķim (kādam mērķim tiek ievākti paraugi) un prioritāri izvietojot tās lūšu pārvietošanās un iezīmju atstāšanas vietās.
- Matu lamatās ir iespējams ievākt matu, kā arī urīna (dzīvniekam atstājot iezīmi uz substrāta virsmas, kur piestiprināta lamata) un siekalu (matu lamatas postījuma laikā – plēšot un košļājot ķemmītes daļu) paraugus. Turpinot pētījumus, jānodrošina pēc iespējas kvalitatīvāka parauga ievākšana sekmīgai paraugu molekulāri ģenētiskai izpētei. Izmantojot matu lamatas, nepieciešams uzlabot matu lamatu modeli (ērtāka un efektīvāka matu paraugu savākšana, izvairoties no dažādu indivīdu paraugu sajaukšanās; ērta lamatas nomaīņa tās bojājuma gadījumā).
- Slēpņa kameras ir efektīva metode gan gadījuma novērojumu apzināšanai, gan sistemātiskai teritorijas uzraudzībai. Īpaši slēpņa kameru priekšrocības izpaužas, ja populācijā ir lūši ar individuālām pazīmēm (apmatojuma plankumainība, specifiskas ķermeņa daļu pazīmes).
- Dati no slēpņu kamerām kombinācijā ar matu lamatu izmantošanu, dod papildus iespēju salīdzināt un vērtēt fiksēto indivīdu fenotipisko un genotipēto pazīmju unikālo sakritību.
- Pētījuma laikā izstrādātas DNS izdalīšanas metodikas no visiem ievāktiem parauga veidiem – sniega paraugiem (pēdu nospiedumi, urīns), matiem, uztriepēm (pēdu nospiedumi, urīns), ekskrementiem. Rezultātu ticamību turpmākajos pētījumos var uzlabot, izmantojot papildus marķierus. Veicot sugas identifikāciju matu paraugiem, kuros iespējams ievākt matus ne tikai no mērķsugas, bet arī no citām sugām, uzlabos sekmīguma rādītājus.

- Ģenētiskās analīzes ir nepieciešama neinvazīvā monitoringa daļa, jo tā dod precīzu informāciju par indivīdu identitāti (kurus nav iespējams atšķirt, izmantojot slēpņu kameras datus), kā arī dod iespēju iegūt informāciju par ģenētisko daudzveidību un radniecību.
- Praksē pārbaudītās lūšu monitoringa metodes, turpinot pilnveidot pieredzi minētajās niansēs matu lamatu efektivitātes palielināšanā un kvalitatīva DNS izdalīšanā no iegūtajiem paraugiem, ir pietiekošs pamats pārejai uz lūšu monitoringa neinvazīvām metodēm Latvijā un iegūto rezultātu salīdzināmībai ar citās Eiropas valstīs izmantoto monitoringa metožu rezultātiem.

4. Pateicības

Autoru kolektīvs izsaka pateicību SIA “Rīgas meži” Katrīnas mežniecībai un īpaši mežzinim Jānim Zālītim, Ķemeru nacionālā parka fonda valdes priekšsēdētājam Andim Liepam un Meža pētīšanas stacijas direktoram Mārtiņam Līdumam par atbalstu lūšu matu lamatu uzstādīšanā savās apsaimniekotajās teritorijās.

5. Literatūra

- Allen M.L., Hočevār L., de Groot M., Krofel M. 2017. Where to leave a message? The selection and adaptive significance of scent-marking sites for Eurasian lynx. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 71: 136. DOI 10.1007/s00265-017-2366-5
- Breitenmoser U., Breitenmoser-Würsten Ch., Okarma H., Kaphegyi Th., Kaphegyi-Wallmann U., Müller U. M. 2000. The Action Plan for the Conservation of the Eurasian Lynx (*Lynx lynx*) in Europe. – *Nature and environment*, No. 112, 69 pp
- Boitani L., Alvarez F., Anders O., Andren H., Avanzinelli E. et al. 2015. Key actions for Large Carnivore populations in Europe. Institute of Applied Ecology (Rome, Italy). Report to DG Environment, European Commission, Bruxelles. Contract no. 07.0307/2013/654446/SER/B3
- Bojārs E., Ruņģis D.E., Ornicāns A., Ozoliņš J., Veinberga I., Krivmane K., Beļeviča V., Bagrade G. 2019. Rekomendācijas brūnā lāča populācijas stāvokļa monitoringa uzlabošanai Latvijā ar molekulārās ģenētikas metodēm. LVMI “Silava”, 19 lpp. <http://www.silava.lv/24/section.aspx/View/228>
- Carim K.J., McKelvey K.S., Young M.K., et al. 2016. A protocol for collecting environmental DNA samples from streams. USDA For Serv - Gen Tech Rep RMRS-GTR 2016:1–18
- Chapron G., Kaczensky P., Linnell J.D.C., von Arx M., Huber D. et al. 2014. Recovery of large carnivores in Europe’s modern human-dominated landscapes. *Science* 346(6216): 1517–1519
- Fležar U., Pičulin A., Bartol M., Černe R., Stergar M., Krofel M. 2019. Eurasian lynx (*Lynx lynx*) monitoring with camera traps in Slovenia in 2018-2019. LIFE Lynx project report. Slovenia

Forest Service and University of Ljubljana, Ljubljana, 16 pp

Franklin T.W., McKelvey K.S., Golding J.D., et al. 2019. Using environmental DNA methods to improve winter surveys for rare carnivores: DNA from snow and improved noninvasive techniques. *Biol Conserv* 229:50–58. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.11.006>

Heurich M., Müller J., Burg M. 2012. Comparison of the effectivity of different snare types for collecting and retaining hair from Eurasian Lynx (*Lynx lynx*). *European Journal of Wildlife Research* 58: 579–587

Kaczensky P., Chapron G., von Arx M., Huber D., Andrén H., Linnell J. (eds). 2013. Status, management and distribution of large carnivores – bear, lynx, wolf and wolverine – in Europe. Part 2 - Species Country Reports. Report: 1-201

KORA Foundation. 2022. 50 years of lynx presence in Switzerland. KORA Report Nr. 99e, 80 pp

Krofel M., Hočevár L., Allen M.L. 2017. Does human infrastructure shape scent marking in a solitary felid? *Mammalian Biology* 87: 36-39

LVMI "Silava", 2020. Pārskats par pētījumu Lielo plēsēju populāciju stāvokļa izmaiņas medību ietekmē, 19 lpp. <http://www.silava.lv/24/section.aspx/View/265>

LVMI "Silava", 2021. Lāču monitorings 2020.-2022. gadā. Pārskats par 2021. gadu, 20 lpp. <http://www.silava.lv/23/section.aspx/View/266>

McDaniel G.W., McKelvey K.S., Squires J.R., Ruggiero L.F. 2000. Efficacy of lures and hair snares to detect lynx. *Wildlife Society Bulletin* 28: 119–123

Menotti-Raymond M., David V.A., Lyons L.A., et al. 1999. A Genetic Linkage Map of Microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Genomics* 57:9–23. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5743>

Menotti-Raymond M.A., David V.A., Wachter L.L., et al. 2005. An STR Forensic Typing System for Genetic Individualization of Domestic Cat (*Felis catus*) Samples. *J Forensic Sci* 50:1–10. <https://doi.org/10.1520/jfs2004317>

MK noteikumi Nr.396 (14.11.2000.) "Noteikumi par īpaši aizsargājamo sugu un ierobežoti izmantojamo īpaši aizsargājamo sugu sarakstu", 1. pielikums "Īpaši aizsargājamo sugu saraksts". (grozīts ar MK 12.04.2022. noteikumiem Nr. 226)

Ozoliņš J., Bagrade G., Ornicāns A., Žunna A., Done G., Stepanova A., Pilāte D., Šuba J., Lūkins M., Howlett S.J. 2017. Eirāzijas lūša *Lynx lynx* sugas aizsardzības plāns. LVMI Silava, Salaspils, 82 lpp

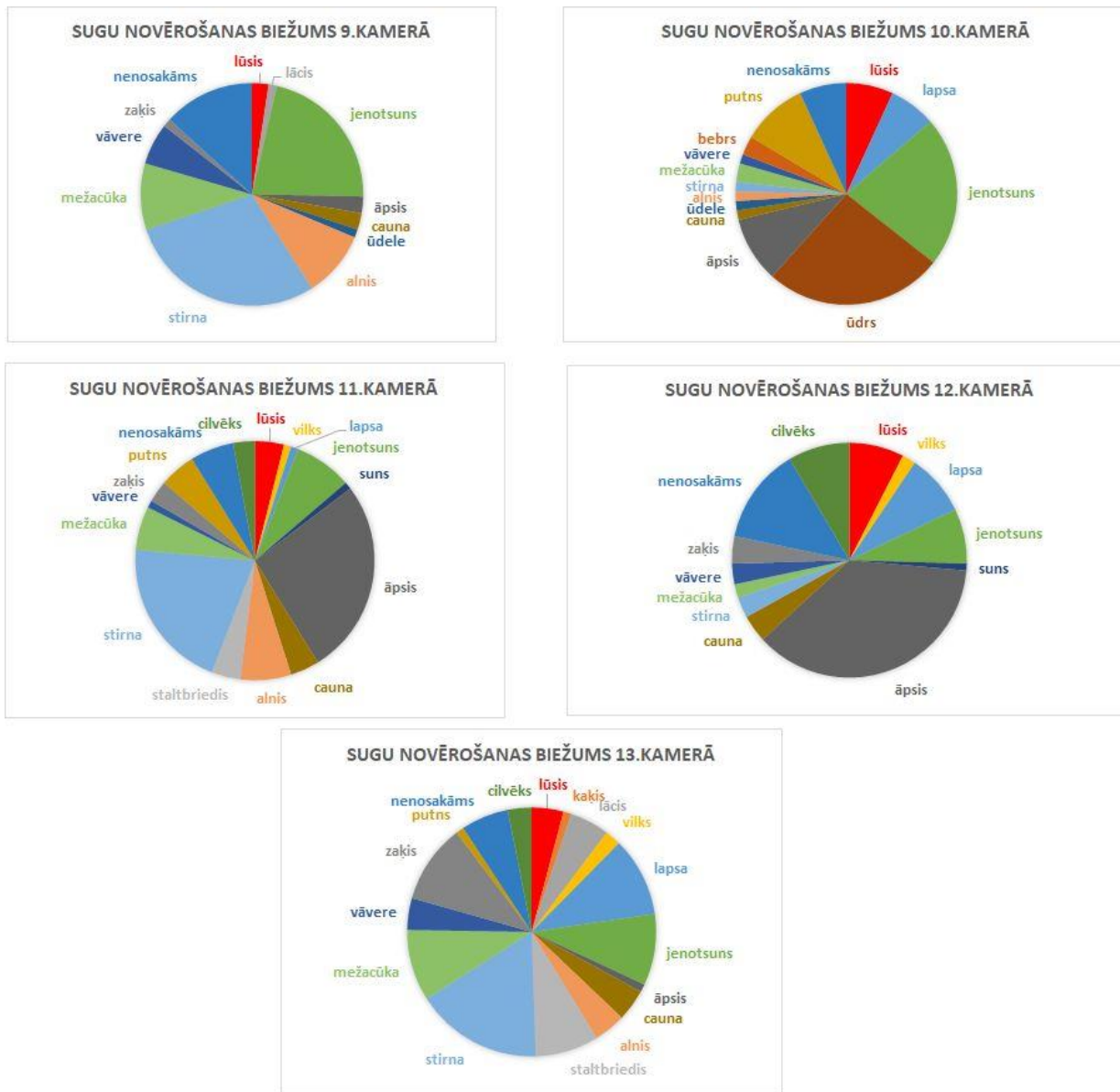
Ozoliņš J., Bagrade G., Männil P., Balčiauska L. (in press). Eurasian lynx in Latvia: experience gained and future challenges at a population level. *CAT News* 75

Padomes Direktīva 92/43/EEK (1992. gada 21. maijs) par dabisko dzīvotņu, savvaļas faunas un floras aizsardzību

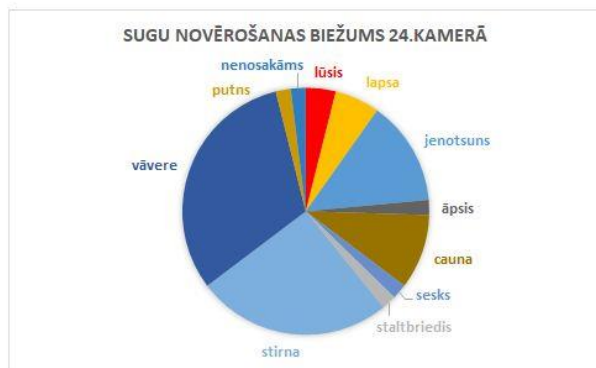
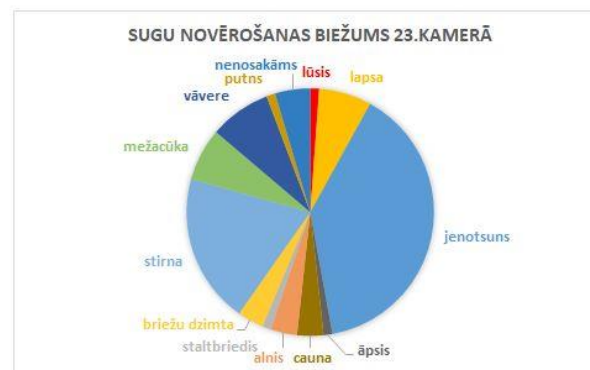
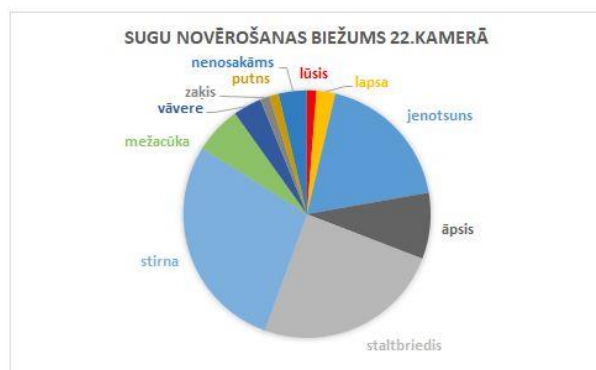
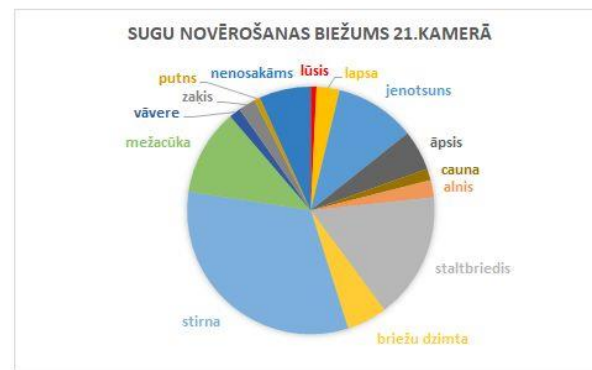
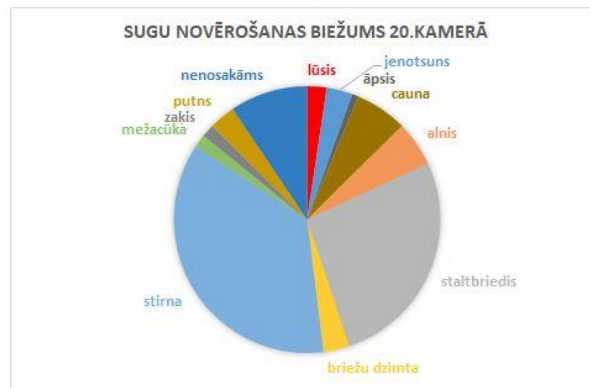
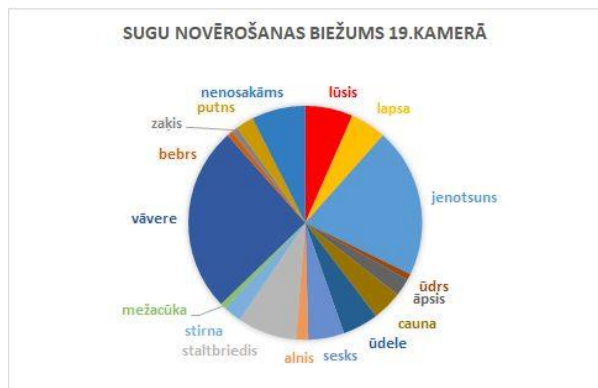
Schmidt K., Kowalczyk R. 2006. Using Scent-Marking Stations to Collect Hair Samples to Monitor Eurasian Lynx Populations. *Wildlife Society Bulletin* 34: 462–466

- Schmidt K., Adeikis P., Balčiauskas L., Godoy J., Kleinman-Ruiz D., Lucena-Perez M., Männil P., Marmesat E., Ozoliņš J., Ratkiewicz M., Shkvyria M. & Solovei I. 2021. Conserving the north-eastern European lowland population of Eurasian lynx. *Cat News Special Issue* 14, 9–11
- Sunquist M.E., Sunquist F.C. 2009. Family Felidae. Pp 54-170 in: Wilson D.E. and Mittermeier R.A. eds. (2009). *Handbook of the Mammals of the World. Vol 1. Carnivores.* Lynx Editions, Barcelona
- Tsuji S., Takahara T., Doi H., et al. 2019. The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis – A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environ DNA* 1:99–108. <https://doi.org/10.1002/edn3.21>
- Vogt K., Zimmermann F., Kölliker M., Breitenmoser U. 2014. Scent-marking behaviour and social dynamics in a wild population of Eurasian lynx *Lynx lynx*. *Behavioural Processes* 106: 98–106
- von Arx M., Breitenmoser-Würsten Ch., Zimmermann F., Breitenmoser U. (Eds.) 2004. Status and conservation of the Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Europe in 2001. KORA Bericht Nr. 19, 330 pp

1. pielikums. Dzīvnieku sugu novērojumi lūšu matu lamatās pēc slēpņa kamerās fiksēto attēlu un video failu skaita Viļķenē



2. pielikums. Dzīvnieku sugu novērojumi lūšu matu lamatās pēc slēpņa kamerās fiksēto attēlu un video failu skaita Kalsnavā.



3. pielikums. Dzīvnieku sugu novērojumi lūšu matu lamatās pēc slēpņa kamerās fiksēto attēlu un video failu skaita Ķemeru nacionālajā parkā

