



Kan DNA från lodjursurin användas för att särskilja familjegrupper av lodjur?

Kan DNA från lodjursurin användas för att särskilja familjegrupper av lodjur?

Rapport från Viltskadecenter, SLU **2018–4**

Författare: Linn Svensson

Utgivare: Viltskadecenter, Institutionen för ekologi, Sveriges Lantbruksuniversitet

Utgivningsort: Viltskadecenter, Grimsö

Utgivningsdatum: 2018-08-17

ISBN: 978-91-984194-2-9

© Viltskadecenter, Institutionen för ekologi, SLU

Omslagsfoto: Snöspårning av lodjur

Fotograf: Linn Svensson

Viltskadecenter

SLU, Grimsö forskningsstation

730 91 Riddarhyttan

www.slu.se/viltskadecenter

Rapporten kan laddas ned som pdf-dokument från Viltskadecenters webbplats:

www.slu.se/viltskadecenter

Den kan även beställas från:

Viltskadecenter, SLU, Grimsö forskningsstation,

730 91 Riddarhyttan

Innehåll

Inledning och bakgrund	2
Genomförande	3
<i>Frågeställningar</i>	<i>3</i>
Material och metod	4
Resultat	5
<i>Resultat fråga 1.....</i>	<i>5</i>
<i>Resultat fråga 2.....</i>	<i>6</i>
<i>Resultat fråga 3.....</i>	<i>7</i>
Diskussion	8
<i>Slutsatser.....</i>	<i>9</i>
Referenser	10

Inledning och bakgrund

Vintern 2014/2015 extraherades och analyserades DNA ur urin från revirmarkeringar av varg. Analyserna genomfördes vid Grimsö DNA-laboratorium, SLU. Analyserna gav bättre resultat än förväntat med 75 % analysframgång (Åkesson 2016). Rutinmässig insamling av vargurin för DNA-analys togs därför i bruk redan vintern därpå inom ramen för länsstyrelsernas varginventering i Sverige. Analyser av urin från varg har från vintern 2013/2014 till vintern 2016/2017 haft mellan 60 % och 75 % framgång gällande bestämning av både art, individ och kön (M. Åkesson 2017 pers. komm). I samband med analyser av vargurin väcktes frågan om motsvarande kunde göras med lodjursurin. Viltskadecenter genomförde med anledning av det ett mindre pilotprojekt rörande DNA-analyser av lodjursurin. Frågeställningen gällande lodjur rör dock bara särskiljning av familjegrupper. Genom att individbestämma honan/modern i de spårade familjegrupperna skulle spårningar med olika familjegrupper kunna särskiljas från varandra. I den här rapporten beskriver vi frågeställning och resultat från tre vintrars mindre omfattande insamling och analys av lodjursurin.

Genomförande

En bra individ- och könsbestämning av ett urinprov är en förutsättning för att provet ska kunna användas. För att sedan kunna särskilja två olika familjegrupper av lodjur med DNA från den vuxna honans revirmarkering krävs, precis som för vargar, att vi vet att det bara är de vuxna revirhävande djuren (i detta fall lodjurshonan) i familjegruppen som markerar revir och inte ungarna. Lodjurens revirmarkeringsbeteende i Sverige är inte särskilt väl dokumenterat vid spårning, till skillnad från vargarnas där mycket information finns. Vi vet dock att vuxna lodjur markerar revir bland annat genom att vända sig om och ”spraya” urin mot föremål, t ex stenar, rotvältor, husknutar, nedhängande grangrenar, men frekvensen är inte väl känd.

Genom att bestämma kön på alla prov som samlades från revirmarkeringar skulle man kunna bedöma hur troligt det är att endast den vuxna honan revirmarkerar i familjegruppen. Om ingen av de insamlade revirmarkeringarna från familjegrupper är av hankön, då är sannolikheten stor att det bara är honan/modern i familjegruppen som revirmarkerar. Detta förutsätter dock att det inte finns någon skillnad i benägenhet att revirmarkera mellan årsungarnas honor och hanar. Det finns i dagsläget inte möjlighet att via genetiska analyser skilja på urin från en vuxen hona och urin från en årunge av honkön. Denna studie fungerar dock som ett sätt att göra en första screening. Om vi hittar urin från hanar så vet vi att metoden *inte* fungerar.

Det finns risk för kontaminering från andra lodjur eftersom vuxna hanar kan kissa över honornas revirmarkering och tvärtom när de rör sig över samma område. I en studie från Schweiz (Vogt et al 2014) noterades även att icke revirhållande djur kunde markera på samma platser som revirhållande djur vilket innebär en komplikation vid tolkning av data. En faktor som det rådde delade meningar om bland länsstyrelsens fältpersonal var frekvensen av revirmarkeringar vid spårning av en familjegrupp. Det var osäkert om det skulle vara möjligt att hitta revirmarkeringar varje gång man spårar en familjegrupp med lodjur i 1 eller 3 km i enlighet med inventeringsmetodiken.

Frågeställningar

- 1) I vilken utsträckning är det möjligt att extrahera DNA ur ett urinprov från en revirmarkering från lodjur för att genetiskt bestämma art, kön och individ?
- 2) Revirmarkerar även ungarna i en familjegrupp? D v s hittas även urin från hanar i revirmarkeringar vid spårning av familjegrupper? I så fall fungerar inte metoden.
- 3) Återfinns revirmarkeringar tillräckligt frekvent för att metoden ska gå att tillämpa inom ramen för nuvarande inventeringsmetodik?

Material och metod

Länsstyrelsernas fältpersonal ombads att på frivillig basis och inom ramen för ordinarie inventering samla in urinprov från lodjur, i början både från ensamma lodjur och familjegrupper men det sista året endast från familjegrupper. Proverna samlades in med samma metod som för varg vilket kräver snö. Urinindränkt snö samlades i ett provrör med en stabiliserande kemikalie som motverkar nedbrytning av DNA. Två olika slags provrör användes, ett med en fast kemikalie i botten (NORGEN-urinrör) och ett annat där motsvarande kemikalie istället tillsattes i form av vätska från en ampull (NORGEN-urinampull). Dessa provrörsmodeller har i denna undersökning använts slumpmässigt och de har vid tidigare jämförelser inte påverkat analysframgången för vargprover. Insamlingen genomfördes under åren 2014–2017. Proverna analyserades av DNA-labbet på Grimsö forskningsstation, SLU, med hjälp av mikrosatelliter. Individbestämning har i samband med DNA-analyserna inte genomförts i praktiken, eftersom sannolikheten är hög att 10 fungerande loci räcker för individbestämning. Vi räknar därför prov med minst 10 fungerande loci som lyckade individbestämningar.

Resultat

Totalt 33 prov har samlats in under de tre vintrarna, varav ett samlades direkt ur en urinblåsa vid sövning och radiomärkning av ett lodjur. Tre av proverna har bristfällig insamlingsinformation, men har kunnat användas till delar av analyserna. Tabell 1 visar antal prov som har samlats in respektive vinter samt om de har samlats in längs en spårlopa av en familjegrupp eller ett ensamt lodjur.

Tabell 1. Antal insamlade prov per år.

Vinter	Antal insamlade prov	Varav från ensamma lodjur	Varav från familjegrupper	Okänt
2014/2015	22	9	12	1
2015/2016	6	1	5	0
2016/2017	3	1	2	0
Info saknas	2			2
Totalt	33	11	19	3

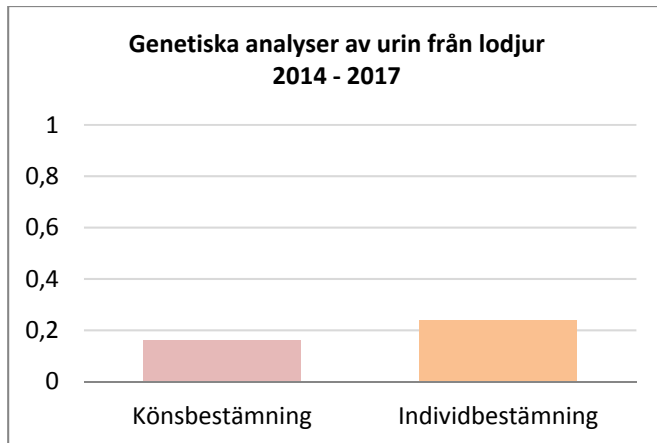
Resultat fråga 1

För 5 (16%) av de 32 proven insamlade vid spårning har både individbestämning och könsbestämning genererat ett lyckat resultat. Analysframgången för individbestämningen är något högre (22%) än för könsbestämningen (16%), tabell 2. Resultatet för lodjur är dock lägre jämfört med varg, där analysframgången för individ och könsbestämning per inventeringsperiod ligger på 60% – 75% (M. Åkesson 2017 pers. komm), beroende på väder. Ett av lodjursproven var kontaminerat med annan urin, mest sannolikt från ett annat lodjur.

Tabell 2. Analysframgång för genetisk individ- och könsbestämning från lodjursurin. 32 prov insamlade i fält vid spårning.

Social grupp	Analysframgång individbestämning	Analysframgång könsbestämning	Kön och individ
Familjegrupp	32 % ¹	26 %	26 %
Ensam lodjur	10 % ¹	0	0
Totalt	22 % ¹	16 %	16 %

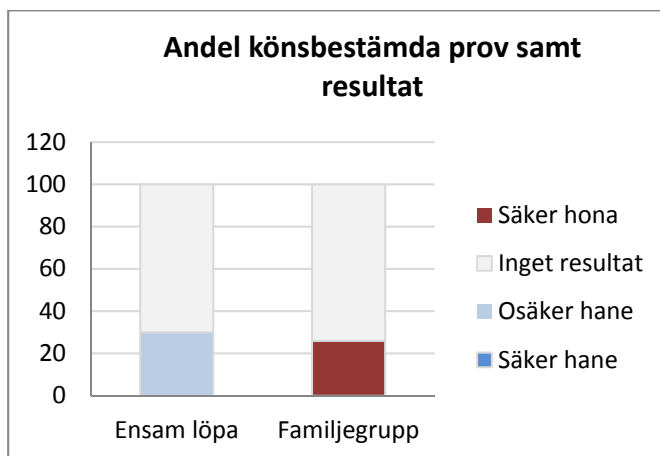
¹ Analysframgång för individbestämning mäts här i antal fungerande loci för ett prov. Minst 10 fungerande loci kommer sannolikt att generera en lyckad individbestämning.



Figur 1. Andel av de 32 i fält insamlade proven som lyckats avseende könsbestämning respektive individbestämning.

Resultat fråga 2

Endast 5 (16 %) av 32 prov insamlade i fält gav en säker könsbestämning, alla fem prov var honor och alla var insamlade vid spårning av familjegrupper. Ett var samlat i en hukande urinering (ej revirmarkering) och resterande från revirmarkeringar. Ett sjätte lyckat prov var från en hane, men provet samlades direkt från urinblåsa vid fångst och märkning av lodjur. Därtill gav 3 provresultatet ”osäker hane” (mer sannolikt hane än hona) alla dessa prov var insamlade i spår efter ett ensamt djur.



Figur 2. Andel av insamlade prov där könsbestämningen har lyckats eller gett osäkert resultat. Inga honor har identifierats i prov från löpor av ensamma djur och inga hanar i löpor av familjegrupper. Notera att det är osäkra bestämningar av hanar.

Resultat fråga 3

Nitton prov från 14 olika spårningar av familjegrupper har samlats in. I två av spårningarna har 5 respektive (inget av dessa fungerade) 2 prov samlats in. Vid de 14 spårningarna spårades i genomsnitt 2 km per insamlat prov. De spårade sträckorna per spårning varierade mellan 1 och 5,6 km. Frekvensen av revirmarkeringar längs spårningarna har dock inte dokumenterats och det är därför okänt hur många revirmarkeringar som har observerats men inte samlats in.



Figur 3. När lodjuren revirmarkerar på snölösa föremål har det inte varit möjligt att fånga upp urin. Rådande insamlingsmetod kräver att urinen landar på snö som kan samlas upp och läggas i provrör. Foto: Linn Svensson.

Diskussion

Att få prov har samlats in under de tre åren indikerar att få revirmakeringar/urinerar av lodjur har hittats jämfört med varg, där revirmarkeringar är vanligt förekommande i spårloporna. Anledningar till det kan vara att lodjuren urinmarkerar mindre ofta och/eller i stor utsträckning urinerar på platser där urinen inte landar på snö, t ex på sidan av stenar, rotvältor, husknutar på små uthus, lador, ödehus, nedhängande grangrenar och liknande, figur 3. Några i fältpersonalen har påtalat just att de ser att lodjuren har ”backat emot” föremål och sannolikt revirmarkerat men att urinen inte syns eller går att fånga upp då markeringsföremålet saknar snö.

I den här studien var den genetiska analysframgången för lodjursurin betydligt sämre jämfört med de vargprov som samlas inom länsstyrelsernas inventering av varg. Det prov som fungerade allra bäst i studien, d v s hade flest fungerande loci, var det som togs direkt ur blåsan på ett sövt lodjur. Några av de insamlade proven var samlade i form av urin som antogs ha droppat ned på isen under icke snöklädda grankvistar där lodjuren såg ut att ha urinerat. Inget av dessa prov har fungerat medan fler prov av de som samlades direkt i markeringsfläcken har gett resultat. Eftersom det fanns några prov där analysen lyckats bra både gällande individ och kön så antar vi att prov kan analyseras med framgång om tillräcklig mängd DNA fångas upp. Möjligheterna att upptäcka och samla in urinen även på annat underlag än snö skulle då behöva undersökas. Den här studien innehåller för få prov för att med god säkerhet kunna sätta en generell analysframgång för individ och könsbestämning av DNA från lodjursurin från revirmarkeringar. Men den indikerar att analysframgången är lägre än för varg med samma insamlingsmetod. Dock finns redan nu utrymme för högre analysframgång på individbestämning om SNP-metoden utvecklas för lodjur då det är en känsligare metod.

Könsfördelningen i de få prov som fungerade såg dock bra ut, med endast honor i de prov som samlats från familjegrupper. Det antyder att proven sannolikt kommer från den vuxna honan, men provstorleken är liten. Om prov även hade samlats in från ungars urin borde dock något/några ha varit från hanar. Den information som efterfrågades här, d v s om det bara är de vuxna djuren som markerar revir, har nu under de tre år som gått till viss del kunnat samlas in via länsstyrelsernas viltkameror. Länsstyrelserna har fångat ett antal familjegrupper på bild och det finns endast enstaka fall där det ser ut som att en unge revirmarkerar, däremot finns ett stort antal filmsekvenser och bilder som visar att honan i familjegrupperna revirmarkerar (muntligen från länsstyrelserna). Även data från en studie i Schweiz (Vogt et al 2014) visar att det endast är den vuxna honan i familjegruppen som revirmarkerar. Vare sig årsungar av hon- respektive hankön verkar således vara benägna att revirmarkera när de går tillsammans med modern.

När det gäller frekvensen av revirmarkeringar är detta fortsatt osäkert. Provstorleken i denna studie är liten och det finns få redovisade studier i ämnet. Det finns inte heller någon information från nuvarande inventering av lodjur i Sverige, eftersom förekomst av revirmarkeringar inte används för att bedöma status och därför inte noteras i databasen Rovbase. Den genomsnittligt spårade sträckan i den här studien var 2 km vilket är längre än de 1 km som enligt instruktionen krävs för spårning av familjegrupp med minst 3 individer, men kortare än de 3 km som krävs för spårning av 2 individer i sällskap.

Ett av de fungerande prov som samlades i den här studien var kontaminerat. Studien i Schweiz samt även länsstyrelsernas egna viltkameror från doftstationer i Sverige visar att det är vanligt att det kommer ensamma vuxna lodjur efter familjegrupperna och urinmarkerar på samma plats som honorna i familjegruppen har markerat. Det innebär en uppenbar kontamineringsrisk och eftersom det finns exempel från Sverige med endast en halvtimme mellan besöken av olika lodjur vid samma kamerastation kommer DNA att kunna vara av ungefär samma ålder och i samma

nedbrytningsstadie, d v s ha samma möjlighet att fångas upp i ett prov. Möjligen blir doftstationer med olika former av lockbete och utplacerade lämpliga markeringsobjekt föremål för fler besök från olika lodjur jämfört med de ”vanliga” markeringar som lodjuren gör under de dagliga vandringarna i hemområdet. Kontamineringsrisken går dock inte att negligera och om en annan hona markerar över en hona i en familjegrupp innebär det en risk för en felbedömning i ett särskiljningsfall.

Slutsatser

Analysframgången av DNA i studien var låg och en anledning till det kan vara att det är svårt att fånga upp tillräcklig mängd urin då lodjuren ofta kissar på föremål som inte är täckta av snö. Insamlingsmetoden som har testats kräver att urinen landar i snö och några bra prov med kvalitet har samlats in. Metoder för att upptäcka och samla in urin på icke snöklädda föremål behöver utvecklas. Då fältpersonalen trots allt vid flera tillfällen hittat en eller flera urinmarkeringar bedömer vi att metoden har potential att användas som särskiljningsmetod av familjegrupper vid spårning, dock i begränsad omfattning ännu. Metoden kan även fungera vid kamerastationer, men då behöver en annan insamlingsmetod för att samla upp urin utvecklas.

Det kan också finnas potential för att med hjälp av DNA från urin särskilja familjegrupper som fotograferas vid kamerastationer om det inte är möjligt att särskilja dessa på foto eller med avståndskriterier.

VSC föreslår att:

Genetisk individbestämning via urin från revirmarkerande lodjurshonor i familjegrupper bör skrivas in som särskiljningsmetod i instruktionerna (LODJUR: Instruktion för att fastställa antal föryngringar (familjegrupper); Instruktion för fastställande av föryngring samt Särskiljning och gruppering i fält). Metoden kan komplettera i områden där AK inte ger en rättvisande bild av antal familjegrupper. Vi bedömer att det kommer att röra sig om ett fåtal fall per inventeringssäsong, åtminstone i början.

En insamlingsmetod utvecklas för att vid spårning upptäcka och samla in tillräcklig mängd DNA och urin från revirmarkeringar som gjorts på föremål utan snö.

Vi föreslår även att VSC tillsammans med personal från länsstyrelser undersöker möjligheter att fånga upp DNA från urin från revirmarkerande individer vid kamerastationer, utan att DNA har kontaminerats av annan lodjursindivid eller annan art.

Referenser

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. [Volume 106](#), July 2014, Pages 98-10.

Åkesson M (2015). Teknisk rapport över genetiska analyser på varg i Sverige år 2014. Ekologiska institutionen Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU.

Åkesson M (2017). Personlig kommentar. Ekologiska institutionen Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU.

Bilaga 1. Insamlade prov samt kommentarer och resultat.

ROVBASEID	SEP-nummer	Län	Insamlingsdatum	Plats	Kommentar	Familjegrupp 1= Ja	Bedömning kön	Kontamination	N loci
R487090	SEP0000210	E	2015-01-20	Ödesjöboda	Provet är taget från en mindre gran som lon har urinerat mot, ingen synlig urin men stark lukt, det var ytterst lite snö kvar på grangrenen så detta får ses som ett test. 1 djur i löpa	0	0	0	0
R487233	SEP0000211	H	2015-01-22	Ruda by Mörlunda	Färska löpa men även äldre spår från räv eller hund på samma plats. Lon har markerat på stolpe, synligt urin. Även andra äldre löpor från okänt djur har varit vid stolpen.	0	0	0	0
	SEP0019309	O	2015-01-25		1 djur, revirmarkering	0	M?	0	11+3
	SEP0019310	O	2015-01-25		1 djur, revirmarkering	0	M?	0	8+2
R487577	SEP0000212	E	2015-01-28	Täftershalm	Provet taget på urinmarkering mot grankvist, stark lukt men ingen synlig urin	0	0	0	0+0
R487684	SEP0000213	H	2015-01-31	L Bokara	Ren urin taget ur lodjuret Loke vid ommärkning för TEST	0	M	0	17+0
R487684	SEP0000214	H	2015-01-31	L Bokara	Urin taget i snö mot fällväggen där lodjuret Loke hade urinmarkerat, snön var färgad även av annat ? Test Omfångst av lodjuret Loke	0	0	0	0
R487823	SEP0000200	H	2015-02-05	Åkroken	Synlig urin mot snödriva 1 djur i löpa	0	M?	0	7+6
R488191	SEP0025581	S	2015-02-11	Sörmark	1 löpa	0	0	0	0
R495512	SEP0035625	O	2016-02-22	Hökelund	i vuxen	0	0	0	0+2

R500231	SEP0023108	S	2017-01-08	Tiskaretjärn	En löpa fram till markeringen, vuxen hona.	0	0	0	0+0
R486414	SEP0021274	X	2014-12-26	ej reg RB	3 individer, svagt urinfärgat.	1	F	0	12+3
	SEP0020318	T	2014-12-28	Norrmogen	3 individer	1	0	0	0
	SEP0020319	T	2014-12-28	Norrmogen	3 individer	1	0	0	0
	SEP0020320	T	2014-12-28	Norrmogen	3 individer	1	0	0	0
	SEP0020321	T	2014-12-28	Norrmogen	3 individer	1	0	0	0
	SEP0024304	T	2014-12-28	Norrmogen	3 individer	1	0	0	0
	SEP0019306	O	2015-01-23		Två löpor, revirmarkering	1	0	0	0
R487286	SEP0019307	O	2015-01-23		Två löpor, revirmarkering (en löpa fram)	1	0	0	13+3
R488152	SEP0005726	O	2015-02-04	Elseröd / kårebol	3 djur, urinmarkering	1	0	0	1+1
R487928	SEP0026939	C	2015-02-05	Tillinge Lundby	3 individer	1	F	0	16+0
R487982	SEP0028202	T	2015-02-06	Gränbäcken, Hjulsjö	2 individer, UH insamlad , hare kan inte uteslutas	1	0	0	0+0
R488213	SEP0032588	W	2015-02-12	ej reg RB	2 individer, UH insamlad	1	F	0	15+1
	SEP0036197	W	2016-01-19	S Svartnäs	1 urin insamlad efter detaljspårning av 3 individer på snö i drygt 1 km.	1	F	0	16+0
R493666	SEP0034848	S	2016-01-20	Lenungshammar	Urinprov UL, hona med 1 unge.	1	0	1	7+2
R494816	SEP0032841	W	2016-02-11	Horrmondsåsen	3 individer	1	0	0	0+2
R495119	SEP0033374	U	2016-02-15	Galgbacken	Insamlat i löpan efter lodjurshona med unge	1	F	0	16+1
	SEP0021314	X	2016-02-26	Norr om Å, Gnarp	Urin i snö, sprejat mot rotvälta.	1	0	0	3+4
R499061	SEP0068033	X	2016-11-14	Gryttja, Hudiksvall	Lodjursspårning 1+1, se R499061. Urinmarkering mot snöbelagd sten. Svagt gul snö togs i rör - pipett.	1	0	0	3+3
R502563	SEP0095156	S	2017-02-16	Ängen	urin från unge	1	0	0	1+1
	SEP0026937	C	2015-02-05	Rasbo	Kan vara den märkta honan Leonora	?	0	0	0+0
	SEP0027955	?				?	0	0	1+0
	SEP0019308	O?				?	0	0	0

Viltskadecenter (VSC) är ett nationellt kunskapscentrum rörande viltskador på egendom och inventering av stora rovdjur. VSC fungerar som ett servicecentrum för myndigheter, organisationer, djurägare, markägare och allmänhet i dessa frågor. VSC arbetar på uppdrag av Naturvårdsverket och tillhör institutionen för ekologi vid SLU, Sveriges Lantbruksuniversitet.

Viltskadecenter, Grimsö Forskningsstation, 730 91 Riddarhyttan

www.slu.se/viltskadecenter

ISBN: 978-91-984194-2-9

