

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

BILJANA ROBIČ I JOSIPA ROŽIĆ

Upotreba vrsno specifičnih početnica za identifikaciju uzoraka

euroazijskog risa (*Lynx lynx*)

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biologiju, patologiju i uzgoj divljači, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Zdravstveni nadzor divljači (053-0532400-2398) prof. dr. sc. Alena Slavice. Rad je izrađen pod vodstvom Magde Sindičić, dr. vet. med. i dr. sc. Tomislava Gomerčića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009./2010.

## Sadržaj

Uvod	1
Hipoteza	3
Materijal i metode	3
Rezultati	5
Rasprava	7
Zahvala	10
Literatura	11
Sažetak	13
Abstract	14

## Uvod

Po sistematici risovi spadaju u red zvijeri (Carnivora), porodicu mačaka (Felidae), potporodicu pravih mačaka (Felinae), rod ris (*Lynx*). Na Europskom kontinentu obitavaju dvije vrste i to iberijski ris (*Lynx pardinus*), s područja Iberskog tj. Pirenejskog poluotoka, te euroazijski ris (*Lynx lynx*) (BREITENMOSEER i sur., 2000.). Iberijski ris, najugroženija je zvijer Europe i najugroženija mačka svijeta. Vrsta je danas prisutna samo u španjolskoj pokrajini Andaluziji s manje od 200 jedinki i smatra se da je uzgoj u zatočeništvu jedina mogućnost za opstanak ove vrste (BRAUN i sur., 2009.). Euroazijski ris prisutan je u središnjoj Aziji i Rusiji, dok u Europi nastanjuje područje Fenoskandinavije, Baltika i Karpat, te postoji nekoliko izoliranih populacija u zapadnoj i jugozapadnoj Europi (BREITENMOSEER i sur., 2000.). Proganjanje od strane čovjeka, gubitak staništa i niska brojnost najvažnijih plijenskih vrsta tijekom 19. stoljeća su doveli do izumiranja risa na velikom dijelu staništa u Europi. Navedeni uzroci doveli su i do nestajanja risa s područja Dinarskih planina (SINDIČIĆ, 2009.). Posljednji primjerci autohtonog risa ulovljeni su u Hrvatskoj 1903. Sloveniji i Srbiji 1908., Bosni i Hercegovini 1911., te Crnoj Gori 1913. godine (MAJIĆ, 2004.). Početkom sedamdesetih godina 20. stoljeća zaživjela je ideja da se na području Dinarida ponovno naseli ris kao lovna vrsta. Tako je 2. ožujka 1973. godine u Kočevskom rogu (Slovenija) pušteno 6 risova (3 mužjaka i 3 ženke) ulovljenih i dopremljenih iz Slovačke (FRKOVIĆ, 1998.). Od tada se ris proširio i po šumovitim predjelima Hrvatske od granice sa Slovenijom preko Gorskog kotara, padinama Velebita do Like u područja gdje ima zdravih populacija srneće divljači (FRKOVIĆ, 2001.; FRKOVIĆ, 2003.). Prema današnjim procjenama broj risova u Hrvatskoj kreće se od 40 do 60 životinja (SINDIČIĆ i sur., 2010.). Ris je u Hrvatskoj zaštićen temeljem Zakona o zaštiti prirode (N. N. br. 30/94, 126/03) i Pravilnikom o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim, te mnogim međunarodnim ugovorima i konvencijama (Konvencija o biološkoj raznolikosti, Bernska, CITES), a od 2005. godine provodi se Plan upravljanja risom u Republici Hrvatskoj.

Upravljanje i zaštita ugroženim vrstama nije moguća bez poznavanja područja rasprostranjenosti i brojnosti populacije. Najčešći problemi s kojima se istraživači susreću pri dobivanju podataka su mali broj životinja koje se u prirodi teško promatraju i hvataju, a invazivne metode koje uključuju hvatanje i kemijsku imobilizaciju životinja iziskuju velike financijske troškove i uzrokuju stres kod životinja (PALOMARES i sur., 2002.).

Zbog tog razloga u istraživanju, zaštiti i upravljanju divljim životinjama sve se više primjenjuju neinvazivne metode temeljene na molekularnoj genetici (MORIN i WOODRUFF, 1996.; KOHN i WAYNE, 1997.). Iz neinvazivnih uzoraka, poput perja, dlake ili izmeta, prikupljenih bez uznemiravanja životinja izolira se DNA te se koristeći molekularne i statističke metode identificira vrsta i odredi se prisutnost i brojnost životinjskih vrsta na određenom staništu. Uobičajena metoda identifikacija vrste provodi se izoliranjem DNA iz uzorka, pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) se umnoži određeni fragment molekule DNA (najčešće mitohondrijske DNA) te se taj fragment sekvencionira tj. odredi se slijed nukleotida. Sekvenca se uspoređi s podacima iz genske baze podataka te se tako identificira vrsta kojoj uzorak pripada (BARTLETT i DAVIDSON, 1992.; FARRELL i sur., 2000.; AVISE, 2004.). No rabeći vrsno specifične početnice, za umnožavanje DNA samo ciljne vrste, vrstu možemo identificirati koristeći samo izolaciju DNA, PCR i elektroforezu. Prisutnost PCR produkta provjerava se elektroforezom na agaroznom gelu, te sekvencioniranje nije potrebno, čime se u kraćem vremenskom roku i s manje materijalnih troškova može dobiti pouzdana identifikacija vrste (PAĐEN i SADARIĆ, 2009).

PALOMARES i sur., (2002.) kreirali su vrsno specifične početnice za identifikaciju iberijskog risa (*Lynx pardinus*). Sintetizirali su četiri para početnica koji amplificiraju fragmente mitohondrijske DNA (mtDNA) kraće od 200 parova baza (pb) tako da se mogu koristiti i u uzorcima sa slabom kvalitetom DNA tj. primarno izmetu koji se najčešće pretražuje prilikom istraživanja iberijskog risa. Početnica je kratak, sintetizirani oligonukleotid koji se koristi u molekularnim istraživanjima. Izrađene su da prepoznaju točno određeni slijed nukleotida u DNA, koji zatim služi kao kalup na koji djeluje DNA polimeraza i umnaža željeni dio lanca. Jedan od najvažnijih čimbenika za uspješnu identifikaciju vrste je specifičnost početnice (PAĐEN i SADARIĆ, 2009.).

Cilj našeg rada bio je ustanoviti mogu li se početnice specifične za iberijskog risa (PALOMARES i sur., 2002.) rabiti za identifikaciju uzoraka euroazijskog risa koji ima stanište na području Hrvatske. Također smo provjerili da li te početnice umnažaju fragmente DNA vrsta koje su najčešći plijen risa te ostalih velikih zvijeri s kojima ris u Hrvatskoj dijeli stanište.

## Hipoteza

Od uzoraka koji su skupljeni neivazivnim metodama vrlo često je nemoguće odrediti kojoj životinjskoj vrsti pripada. Pretpostavlja se da je moguće na temelju gena, tj. lančanom reakcijom polimeraze razlikovati uzorke euroazijskog risa od ostalih vrsta prisutnih u hrvatskim šumama.

## Materijali i metode

Izolirale smo DNA iz 5 uzoraka mišićnog tkiva euroazijskog risa (*Lynx lynx*), 2 uzorka mišićnog tkiva jelena lopatara (*Dama dama*), 1 uzorka mišićnog tkiva muflona (*Ovis musimon*), 2 uzorka mišićnog tkiva jelena običnog (*Cervus elaphus*), 2 uzorka mišićnog tkiva srne (*Capreolus capreolus*), 2 uzorka mišićnog tkiva medvjeda i 2 uzorka mišićnog tkiva vuka (*Canis lupus*). Uzorci su prikupljeni u sklopu provedbe projekata MZOŠ "Istraživanje recentnih i fosilnih velikih zvijeri u Hrvatskoj" (0053303, voditelj prof. dr. sc. Đuro Huber) i „Zdravstveni nadzor divljači“ (0532400-2398, voditelj prof. dr. sc. Alen Slavica). DNA smo iz tkiva izolirale pomoću komercijalnog kita Invitrogen ChargeSwitch gDNA Tissue Kits. Kit izolira DNA koristeći tehnologiju magnetnih kuglica, čiji se površinski naboj mijenja ovisno o otapalu (pufer) u kojem se nalazi. U otapalu niskog pH kuglice su pozitivno nabijene i privlače negativno nabijenu nukleinsku kiselinu. Proteini i ostali zagađivači otopljeni u otapalu se uklone, dok su kuglice pomoću magnetnog stalka (Magna rack) formirane u čvrstu smjesu. Kada se pH otapala podigne na 8.5 naboj kuglica se neutralizira i nukleinska kiselina se otpušta u otapalo.

U epruvetu od 2 ml u kojoj se nalazi "lysis mix" (1 ml "lysis buffer" (L15) i 10 µl proteinasa K, pri sobnoj temperaturi) stavili smo usitnjene uzorke mišićnog tkiva koji su inkubirani u termobloku preko noći na 55 °C. Nakon razgradnje uzorak smo pomiješale s 5 µl RNase, te inkubirale na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Zatim smo 200 µl "purification buffera" (M5) i 40 µl "magnetic beads" pomiješale s uzorkom i inkubirali na sobnoj temperaturi 1 minutu. Epruvete smo stavile u "MagnaRack" da se formiraju čvrste smjese. Otpipetirale smo i uklonile supernatant. Uklonile smo epruvete s "MagnaRack" i dodale 1 ml "wash buffera" i ponovno stavile na "MagnaRack" da se formiraju u čvrstu smjesu. Otpipetirale smo i bacile supernatant i ponovile postupak. Dodale smo 150 µl "elution buffera" (E5) promiješale i inkubirale na sobnoj temperaturi 5 minuta. Supernatant koji sadrži DNA otpipetirale smo u nove epruete.

PCR je proveden s vrsno specifičnim početnicama za umnažanje kontrolne regije mtDNA iberijskog risa (*Lynx pardinus*) koje su kreirali PALOMARES i sur., 2002. (Tablica 1). Liofilizirane početnice su naručene iz Invitrogen™. Prije korištenja, liofilizirane početnice smo otopile u deioniziranoj vodi, s ciljem dobivanja "stock" otopine koncentracije 100 µM, koja se može čuvati na -20° C. Kao radnu otopinu koristile smo smjesu obje početnice (10XPM), u kojoj je koncentracije svake početnice 2 µM.

Tablica 1. Karakteristike rabljenih početnica

Naziv početnice	Početnica	Duljina produkta
DL7F	CTTAATCGTGCATTATACCTTGT	130 pb
CR2bR	CCGGAGCGAGAAGAGGTACA	

Za pripremu PCR smjese koristile smo komercijalni kit QIAGEN Multiplex PCR kit. Umnažanje kontrolne regije mtDNA je rađeno u smjesi volumena 10 µL koja je sadržavala 5µl QIAGEN Multiplex PCR Mastermix, 1µl smjese početnica, 1µl DNA, te 3µl H<sub>2</sub>O. Reakcije su provođene u plastičnim eprueticama od 0,2 ml, MicroAmp Reaction Tubes (8 Tubes/Strip) i MicroAmp Caps (8 Caps/Strip), Applied Biosystems. Reakcija se provodila koristeći uređaj GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Korišten je PCR protokol predložen od strane autora koji su kreirali početnice (PALOMARES i sur., 2002.) (Tablica 2).

Tablica 2. PCR protokol za umnažanje kontrolne regije mtDNA euroazijskog risa

<b>PCR protokol :</b>		
Aktivacija polimeraze	95 °C	15 min
Broj ciklusa:	35	
Denaturacija kalupa	94 °C	90 sec
Prianjanje početnica	62.5 °	90 sec
Produženje lanca	72 °C	60 sec
Završno produženje	72 °C	10 min

Elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu smo provjerile da li je došlo da umnažanja PCR produkta pomoću vrsno specifičnih početnica. Za 1,5% gel debljine 5 mm, u tikvici smo pomiješale 50 ml 1xTBE (10xTBE razrijedili smo s destiliranom vodom u omjeru 1:9), 0,75g agaroze (50 ml TBE x 0,015 = 0,75g), te ih u mikrovalnoj zagrijali do vrenja oko 1 minutu da se agarozna potpuno rastopi. Gel smo ohladile na sobnu temperaturu, te dodale SYBR Safe Gel stain 5 µl. U svaku jažicu stavile smo 5 µl DNA i 2µl loading buffera prethodno pomiješanih na parafilmu. Elektroforeza se odvijala na sobnoj temperaturi, pri konstantnom naponu od 90V, 30 min. Gel smo promatrale pomoću transiluminatora i fotografirale digitalnim fotoaparatom.

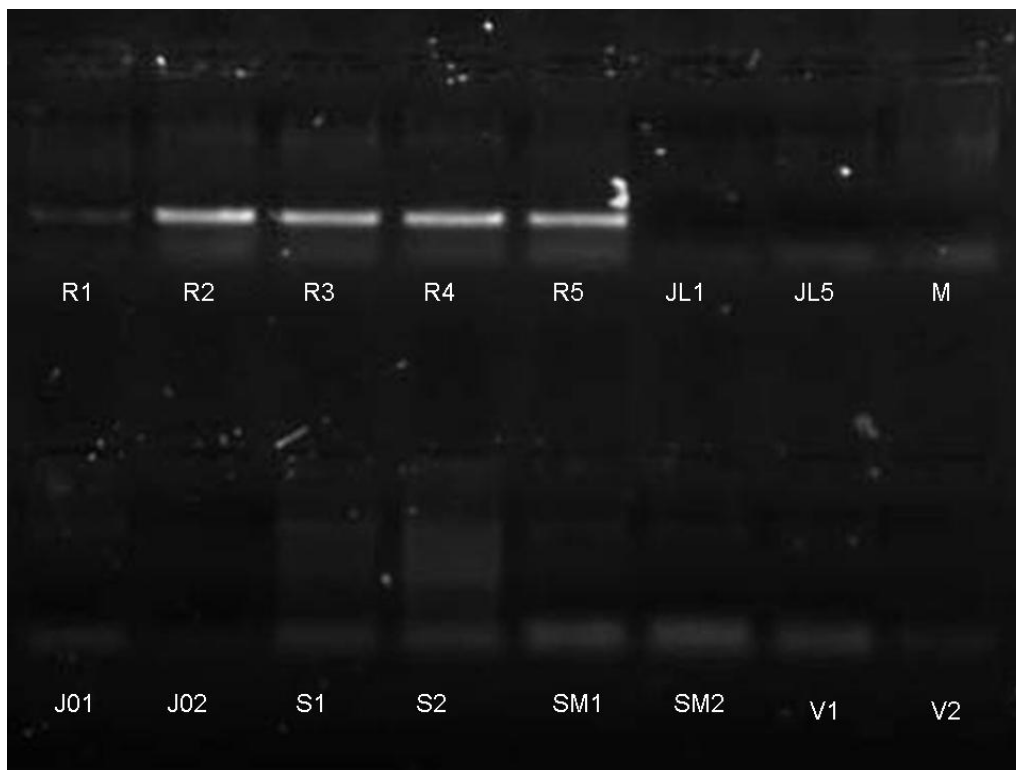
## **Rezultati**

Upotrebom ChargeSwitch gDNA Micro Tissue Kit izolirale smo DNA risa (*Lynx lynx*), jelena lopatara (*Dama dama*), muflona (*Ovis musimon*), jelena običnog (*Cervus elapus*), srne (*Capreolus capreolus*), medvjeda (*Ursus arctos*) i vuka (*Canis lupus*). Nakon umnažanja kontrolne regije mtDNA s vrsno specifičnim početnicama za iberijskog risa (*Lynx pardinus*) elektroforezom na gelu utvrđen je pozitivan rezultat (prisutnost PCR produkta tj. umnažanje kontrolne regije mtDNA) svih 5 ispitanih uzoraka euroazijskog risa (*Lynx lynx*). Uzorci DNA ostalih vrsta životinja uključenih u istraživanje nisu dali PCR produkt tj. početnice se nisu vezale za mtDNA i rezultat elektroforeze na gelu je bio negativan (Tablica 3., Slika 1.).



Tablica 3. Popis istraživanih uzoraka i rezultat elektroforeze na agaroznom gelu

	<b>UZORAK</b>	<b>OZNAKA UZORKA</b>	<b>REZULTAT</b>
1.	RIS ( <i>Lynx lynx</i> )	R1	+
2.	RIS ( <i>Lynx lynx</i> )	R2	+
3.	RIS ( <i>Lynx lynx</i> )	R3	+
4.	RIS ( <i>Lynx lynx</i> )	R4	+
5.	RIS ( <i>Lynx lynx</i> )	R5	+
6.	JELEN LOPATAR ( <i>Dama dama</i> )	JL1	-
7.	JELEN LOPATAR ( <i>Dama dama</i> )	JL2	-
8.	MUFLON ( <i>Ovis musimon</i> )	M	-
9.	JELEN OBIČNI ( <i>Cervus elapus</i> )	JO1	-
10.	JELEN OBIČNI ( <i>Cervus elapus</i> )	JO2	-
11.	SRNA ( <i>Capreolus capreolus</i> )	S1	-
12.	SRNA ( <i>Capreolus capreolus</i> )	S2	-
13.	SMEĐI MEDVJED ( <i>Ursus arctos</i> )	SM1	-
14.	SMEĐI MEDVJED ( <i>Ursus arctos</i> )	SM2	-
15.	VUK ( <i>Canis lupus</i> )	V1	-
16.	VUK ( <i>Canis lupus</i> )	V2	-



Slika 1: Rezultat elektroforeze na gelu, uzorci risa (R1 do R5), jelena lopatara (JL1, JL5), muflona (M), običnog jelena (JO1, JO2), srne (S1, S2), medvjeda (SM1, SM2), vuka (V1, V2)

## Rasprava

Utvrđivanje prisutnosti i gustoće populacija životinjskih vrsta prijeko je potrebno za izradu i provedbu planova upravljanja životinjskih vrsta i njihovih staništa. Mnoge su vrste plašljive, malobrojne i imaju skrovišta zbog čega ih je teško pronaći te u prirodi provoditi istraživanja na njima. Euroazijski ris (*Lynx lynx*) jedna je od najugroženijih vrsta u Hrvatskoj, zbog načina života i velikog teritorija kojim se kreće, spada u vrste koje je teško pratiti i promatrati u prirodi, stoga su molekularne metode iznimno važne za istraživanje i upravljanje ovom vrstom. Dosadašnja istraživanja prisutnosti euroazijskog risa temeljila su se na praćenju tragova na snježnom pokrivaču. Ta je metoda manjkava zbog toga što dijelovi risjeg staništa često tijekom zime nisu pokriveni snijegom ili se on dugo ne zadržava, stoga se na tim područjima ne može primijeniti ova metoda praćenja. Kako populaciju risa u Republici Hrvatskoj čini svega 40

do 60 jedinki (SINDIČIĆ i sur., 2010.), to još više otežava njihovo praćenje i prikupljanje materijala za istraživanja.

Zbog činjenice da je populacija nastala razmnožavanjem 6 reintrodiranih jedinki te već preko 35 godina nije u kontaktu sa susjednim populacijama smatra se da je parenje u srodstvu mogući uzrok pada brojnosti populacije (SINDIČIĆ i sur., 2010.), te je potrebno provesti istraživanja populacijske genetike. Pri tome najvažniji izvor podataka predstavljaju neinvazivni uzorci poput izmeta i dlaka, te su istraživane mogućnosti prikupljanja uzoraka dlaka pomoću stupača s mirisnim atraktantom (SINDIČIĆ i sur., 2007.). No kada se u istraživanjima populacijske genetike koriste neinvazivni uzorci prvo je potrebno dokazati da oni pripadaju istraživanoj vrsti, te je tu važna primjena vrsno specifičnih početnica.

Neinvazivne metode za identifikaciju životinjskih vrsta većinom se temelje na detekciji DNA sekvenci, kroz određivanje slijeda baza i filogenetskom analizom (BARTLETT i DAVIDSON, 1992.; FARRELL i sur., 2000.; AVISE, 2004.). Pri tome se najčešće koriste početnice dizajnirane za sekvencioniranje regije koja je konzervirana među različitim vrstama, tako da početnice nisu vrsno specifične i PCR ne može potvrditi pripadnost vrsti, već je potrebno sekvencionirati PCR produkt i provesti filogenetsku analizu. Upotrebom vrsno specifičnih početnica omogućuje se identifikacija vrste samo pomoću PCR reakcije, a izostavlja se skuplje i dugotrajnije sekvencioniranje (PAĐEN i SADARIĆ, 2009.). Tako su PALOMARES i sur. (2002.) kreirali 4 vrsno specifične početnice za istraživanja iberijskog risa, što je uvelike unaprijedilo istraživanje i zaštitu te ugrožene vrste (JOHNSON i sur., 2004.; PERTOLDI i sur., 2005.). Cilj našeg istraživanja bio je utvrditi da li se vrsno specifične početnice dizajnirane za identifikaciju iberijskog risa (*Lynx pardinus*) (PALOMARES i sur., 2002) mogu koristiti za identifikaciju uzoraka euroazijskog risa (*Lynx lynx*). Na svih 5 ispitanih uzoraka euroazijskog risa početnice su dale pozitivan rezultat, a kod svih ostalih ispitanih vrsta negativan, što potvrđuje da se početnice mogu koristiti za identifikaciju euroazijskog risa. U istraživanje smo uključili i uzorke jelena lopatara, jelena običnog, srne i muflona koji su najčešći plijen risa u Hrvatskoj i potvrdili smo da početnice ne umnažaju DNA plijenskih vrsta što je važno prilikom istraživanja izmeta risa. Budući da se u izmetu risa nalazi i DNA plijena, ukoliko se početnice vežu na DNA plijena dobili bi lažno pozitivan rezultat. Ujedno je razlikovanje DNA predatora i plijena važno i prilikom istraživanja prehrane predatora iz izmeta koristeći molekularne metode, koje su puno preciznije od klasičnih metoda koje se

temelje na morfološkoj identifikacija ostataka kostiju i dlaka. Uzorke medvjeda u vuka smo uključili u istraživanje budući da su to preostale dvije vrste velikih zvijeri s kojima risa dijeli stanište u Hrvatskoj, te je razvoj molekularnih metoda za razlikovanje uzoraka vuka, risa i medvjeda važno za upravljanje tim vrstama.

## **Zahvala**

Zahvaljujemo prof. dr. sc. Đuri Huberu što nam je omogućio izradu ovog rada u laboratoriju za molekularnu biologiju na Zavodu za biologiju te financijski pomogao izradu rada. Zahvaljujemo prof. dr. sc. Zdravku Janickom i dr. sc. Deanu Konjeviću na pomoći u nabavi uzoraka. Posebna zahvala Magdi Sindičić dr. vet. med. i dr. sc. Tomislavu Gomerčiću na strpljenju, stručnom i tehničkom vodstvu pri izradi ovog rada.

## Literatura

- AVISE, J. C. (2004): The hope, hype, and reality of genetic engineering. Oxford University Press. New York. USA.
- BARTLETT, S. E., W. S. DAVIDSON (1992): FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* 12, 408-411.
- BRAUN, B. C., A. FRANK, M. DEHNHARD, C. C. VOIGT, A. VARGAS, F. GORITZ, K. JEWGENOW (2009): Pregnancy diagnosis in urine of Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Theriogenology* 71, 754-761.
- BREITENMOSER, U., C. BREITENMOSER-WÜRSTEN, H. OKARMA, T. KAPHEGYI, U. KAPHEGYI-WALLMANN, U. M. MÜLLER (2000): Action plan for the conservation of the Euroasian lynx in Europe (*Lynx lynx*). Council of Europe Publishing. Strasbourg Cedex.
- FARRELL, L. E., J. ROMAN, M. E. SUNQUIST (2000): Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* 9, 1583-1590.
- FRKOVIĆ, A. (1998): Ponovo naseljavanje i ulov risa (*Lynx lynx* L.) u Županiji primorsko-goranskoj u razdoblju od 1974.-1996. godine. *Prirodoslovna istraživanja Riječkog područja, Zbornik radova, Prirodoslovni muzej Rijeka*. str. 493-500.
- FRKOVIĆ, A. (2001): Ris (*Lynx lynx* L.) u Hrvatskoj - naseljavanje, odlov i brojnost (1974-2000). *Šumarski list* 11-12, 625-634.
- FRKOVIĆ, A. (2003): Ris u Hrvatskoj. Primorsko-goranska županija, Upravni odjel za gospodarski razvoj i Lovački savez Primorsko-goranske županije. Rijeka.
- JOHNSON, W. E., J. A. GODOY, F. PALOMARES, M. DELIBES, M. FERNANDES, E. REVILLA, S. J. O'BRIEN (2004): Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx population. *Journal of Heredity* 95,19-28.

- KOHN, M. H., R. K. WAYNE (1997): Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 12, 223-227.
- MAJIĆ, A. (2004): Plan upravljanja risom u Hrvatskoj. Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja Republike Hrvatske, Zagreb.
- MORIN, P. A., D. S. WOODRUFF (1996): Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. U: *Molecular Genetic Approaches in Conservation* (Smith, T. B., R. K. Wayne, urednici), Oxford University Press, New York. str. 298-313.
- PAĐEN, L., I. SADARIĆ (2009): Izrada vrsno specifičnih početnica za umnažanje mitohondrijske DNA divljih životinja Hrvatske. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- PALOMARES, F., J. A. GODOY, A. PIRIZ, J. O'BRIEN, W. E. JOHNSON (2002): Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* 11, 2171-2182.
- PERTOLDI, C., R. GARCÍA-PEREA, J. A. GODOY, M. DELIBES, V. LOESCHCKE (2005): Morphological consequences of range fragmentation and population decline on the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Zoology* 268, 73-86.
- SINDIČIĆ, M., Đ. HUBER, J. KUSAK, T. GOMERČIĆ, V. SLIJEPČEVIĆ, T. SKRBINŠEK, H. POTOČNIK (2007): Razvoj zamki za prikupljanje uzoraka dlaka risa (*Lynx lynx*). Zbornik sažetaka "Veterinarska znanost i struka". Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. str. 19.
- SINDIČIĆ, M. (2009): Euroazijski ris - leopard hrvatskih šuma. *Meridijani* 140, 60–66.
- SINDIČIĆ, M., N. SINANOVIĆ, A. MAJIĆ SKRBINŠEK, Đ. HUBER, S. KUNOVAC, I. KOS (2010): Legal status and management of the Dinaric lynx population. *Veterinaria* 58 (3-4), 229-238.

# Upotreba vrsno specifičnih početnica za identifikaciju uzoraka

euroazijskog risa (*Lynx lynx*)

BILJANA ROBIČ I JOSIPA ROŽIĆ

Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači

Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu

---

**ROBIČ, B., J. ROŽIĆ. (2010.):** Upotreba vrsno specifičnih početnica za identifikaciju uzoraka euroazijskog risa (*Lynx lynx*)

## Sažetak

Cilj našeg rada bio je istražiti mogu li se početnice dizajnirane za identifikaciju iberijskog risa (*Lynx pardina*) mogu koristiti za identifikaciju uzoraka euroazijskog risa (*Lynx lynx*). Euroazijski ris (*Lynx lynx*) jedna je od najugroženijih vrsta u Hrvatskoj, zbog povučenog načina života i velikog teritorija kojim se kreće spada u vrste koje je teško pratiti i promatrati u prirodi, stoga su molekularne metode iznimno su važne za istraživanje i upravljanje ovom vrstom. Upotrebom vrsno specifičnih početnica omogućuje se identifikacija vrste iz minimalnih količina tkiva samo pomoću PCR reakcije i elektroforeze na gelu, a izostavlja se skuplje i dugotrajnije sekvencioniranje. Na svih 5 pretraženih uzoraka euroazijskog risa rezultat je bio pozitivan, što potvrđuje da se početnice mogu koristiti za identifikaciju euroazijskog risa. Na istraživanim uzorcima plijena risa (jelen lopatar, jelen obični, srna, muflon) i velikih zvijeri s kojima ris dijeli stanište (smeđi medvjed, vuk) početnice nisu djelovale.

**Ključne riječi:** euroazijski ris (*Lynx lynx*), iberijski ris (*Lynx pardinus*), početnica, mitohondrijska DNA, lančana reakcija polimerazom

---



# **Application of species specific primers for identification of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) samples**

BILJANA ROBIČ and JOSIPA ROŽIĆ

Department for game biology, pathology and breeding

Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

---

## **ROBIČ, B., J. ROŽIĆ. (2010.): Application of species specific primers for identification of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) samples**

### **Abstract**

The goal of our research was to establish if primers designed for the identification of Iberian lynx (*Lynx pardina*) can be applied for identification of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) samples. Eurasian lynx (*Lynx lynx*) is one of the most threatened species in Croatia, and as it occupies large territories and is afraid of humans, monitoring and research in the nature is difficult. Because of that molecular methods are very important for the research and management of this species. By using species specific primers animal species can be identified from minimal quantities of different tissues using only PCR and electrophoresis, without the time consuming and expensive sequencing. All of the 5 researched Eurasian lynx samples gave positive result, confirming that primers can be used for Eurasian lynx identification. Samples of lynx prey (fallow deer, roe deer, red deer, mouflon) and large carnivores species Eurasian lynx shares habitat in Croatia (brown bear, wolf) were not amplified with lynx species specific primers.

**Key word:** Eurasian lynx (*Lynx lynx*), Iberian lynx (*Lynx pardina*). primer, mitochondrial DNA, PCR protocol

---