



Sfinansowano ze środków funduszu leśnego
Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasów Państwowych

RAPORT Z REALIZACJI PROJEKTU

Wpływ drapieżnictwa lisa rudego *Vulpes vulpes* na populacje gatunków chronionych i zagrożonych wyginięciem w Tatrzańskim Parku Narodowym



dr inż. Jan Cichocki, dr inż. Agnieszka Ważna, Katedra Zoologii, Uniwersytet
Zielonogórski

dr Katarzyna Janik-Superson, mgr Jakub Lach, dr Dominik Strapagiel,
Pracownia Biobank, Uniwersytet Łódzki

Zielona Góra, 2019

Spis treści

Wstęp	3
Cele badań	5
Material i metody	6
Wyniki	15
Podsumowanie	18
Literatura	22
Załączniki	24

Wstęp

Lis rudy *Vulpes vulpes* jest przedstawicielem rodziny psowatych Canidae z rzędu drapieżnych Carnivora. Do rodziny tej należą również występujące w Polsce wilk szary *Canis lupus*, jenot azjatycki *Nyctereutes procyonoides* oraz szakal złocisty *Canis aureus*. Psowate są zwierzętami o średniej wielkości ciała, charakteryzujące się dużym udziałem mięsa w diecie oraz palchochodnością (Fot. 1).



Fot. 1. Tropy lisa rudego *Vulpes vulpes* przy czynnej norze w obwodzie ochronnym Kośce Hamry w Tatrzańskim Parku Narodowym (Fot. J. Cichocki)

Lisy charakteryzują się oportunizmem środowiskowym i występują na terenie całego kraju, również na obszarach zurbanizowanych. Niektóre osobniki cechują się brakiem strachu przed człowiekiem, szczególnie gdy są dokarmiane np. w miejscach o wysokiej aktywności turystycznej ludzi (Fot. 2). Populacje zasiedlające zwarte obszary leśne preferują przy tym ich skraje, co jest związane z tendencją do polowań na terenach otwartych (Jędrzejewska i Jędrzejewski 2001) (Fot. 3). Lis rudy jest w Polsce gatunkiem łownym z wyznaczonym

okresem ochronnym. Gatunek ma status LC na Czerwonej Liście gatunków zagrożonych IUCN (Hoffmann M. i Sillero-Zubiri C. 2016).



Fot. 2. Lis rudy *Vulpes vulpes* penetrujący rejon Kasprowego Wierchu w Tatrzańskim Parku Narodowym (Fot. J. Cichocki)

Lis jest oportunistą pokarmowym, którego dieta uzależniona jest od lokalnej dostępności zasobów środowiska. Wykazuje zarówno znaczną zmienność geograficzną, jak i sezonową w składzie diety. Skład pokarmu lisa jest równocześnie dużo bardziej złożony od diety wilka. Podstawowym składnikiem diety lisa, polującego chętnie na terenach otwartych są różne gatunki norników *Microtus* sp. W mniejszym stopniu lisy polują na gryzonie leśne: myszarki *Apodemus* sp. i nornice rude *Clethrionomys glareolus*. Znaczny udział w pokarmie drapieżnika ma padlina kopytnych, zarówno dziko żyjących, jak i udomowionych. Ponadto w diecie lisa stwierdzane są ptaki Aves, gady Reptilia, płazy Amphibia, ryby Pisces oraz różne gatunki bezkręgowców Invertebrata. Ponadto lisy zjadają owoce, nasiona oraz innego rodzaju materiał roślinny (Goszczyński 1995, Jędrzejewska i Jędrzejewski 2001). W pokarmie lisa stwierdzano ponadto gatunki objęte ochroną, w tym gatunki rzadkie. Lisy polują na ssaki, takie jak: ryjówki *Sorex* sp., smużki leśne *Sicista betulina*, badyłarki pospolite *Micromys minutus*, wiewiórki pospolite *Sciurus vulgaris*, popielice szare *Glis glis*. W pokarmie lisa stwierdzane są także ginące gatunki kuraków, jak: głuszec *Tetrao urogallus*, cietrzew *Lyrurus tetrix*,

kuropatwa *Perdix perdix* oraz dość pospolity na południu i wschodzie kraju jarząbek *Tetrastes bonasia*. Gatunki te stanowią jednak niewielki odsetek ofiar drapieżnika (Jędrzejewska i Jędrzejewski 2001). Lis uznawany jest jednak za jednego z ważniejszych drapieżników polujących na pisklęta głuszca (Wegge i Kastdalen 2007).

W Tatrach dietę lisa badano w latach 90. XX wieku. Analizy wskazywały na dominację w diecie norników, z przewagą nornika tatrzańskiego *Microtus tatricus* oraz znaczny udział świstaka tatrzańskiego *Marmota marmota*. Niewielki był natomiast udział ptaków (Borkowski 1994).

Cele badań

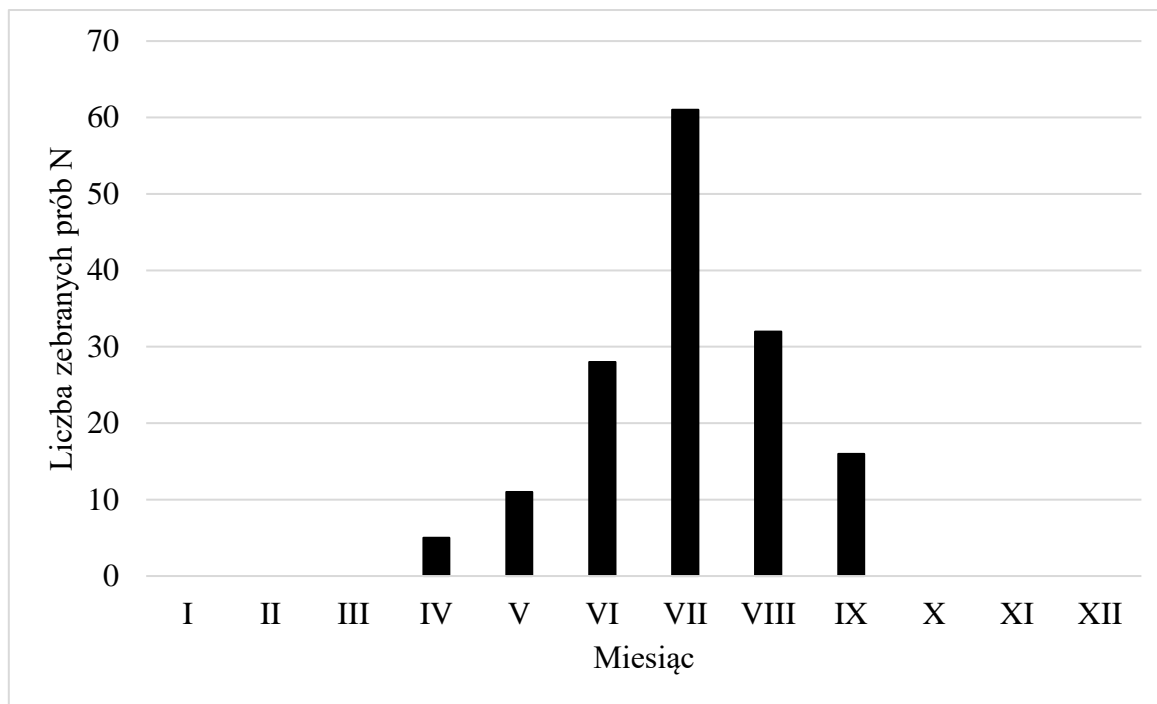
Badania mają na celu określenie składu pokarmowego lisów rudych na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego na podstawie analizy odchodów. Badania pozwolą określić w jakim stopniu lisy mogą wpływać negatywnie na populacje zagrożonych wyginięciem głuszca *Tetrao urogallus* i cietrzewia *Lyrurus tetrrix*, szczególnie na osobniki młode (specyficzny do głuszca i cietrzewia PCR). Celem badań jest również ustalenie udziału gatunków tatrzańskich m.in.: świstaka tatrzańskiego *Marmota marmota*, nornika tatrzańskiego *Microtus tatricus*, śnieżnika europejskiego *Chionomys nivalis* w diecie lisa (metabarcoding). Wyniki badań pozwolą ustalić strategię ochrony rzadkich gatunków w kontekście potencjalnego zagrożenia ze strony drapieżnika.

Material i metody

Odchody lisa były zbierane w 2019 roku przez pracowników Tatrzańskiego Parku Narodowego w okresie od wiosny do jesieni (Załącznik 1, Ryc. 1). W badaniach wykorzystano 153 próby, które po zebraniu zostały wysuszone i zgromadzone w TPN.



Fot. 3. Odchody lisa *Vulpes vulpes* znalezione w Tatrzańskim Parku Narodowym
(Fot. J. Cichocki)



Ryc. 1. Liczba odchodów lisa rudego *Vulpes vulpes* zebrana w 2019 roku

Skład diety lisa analizowano poprzez oznaczanie w warunkach laboratoryjnych niestrawionych fragmentów ofiar. Pierwszym etapem analiz było namoczenie prób przez 24h i przepłukanie pod bieżącą wodą na sicie o średnicy 1mm w celu uzyskania jedynie oznaczalnych elementów pokarmu. Przepłukane odchody suszono następnie przez dobę w temperaturze 60°C i ważono. Gatunki ssaków w diecie lisa oznaczono na podstawie analizy oznaczalnych elementów czaszki oraz pojedynczych zębów (Pucek 1984). Przy braku elementów kostnych przeprowadzono analizę morfologicznej budowy włosów korzystając z kluczy do oznaczania włosów (Dziurdzik 1973, Teerink 1991, Sari i Arpacik 2018). Wówczas ssaki oznaczano w oparciu o trzy podstawowe cechy: typ rdzenia, kształt powłoczki włosa oraz przekrój poprzeczny. Wykorzystano również materiały porównawcze (włosy, rogi, poroża, racice) ze zbiorów prywatnych oraz udostępnione przez TPN. Owady oznaczano przy wykorzystaniu zbiorów porównawczych oraz w oparciu o Klucz do oznaczania owadów (Pławilszczikow 1968). Skład pokarmu lisa wyrażony jest, jako procent prób zawierających resztki danego organizmu w stosunku do liczby analizowanych prób oraz jako procent biomasy zjedzonego pokarmu %B (procent biomasy danego pokarmu lub ofiary w stosunku do całej biomasy zjedzonego pokarmu). Do obliczenia biomasy zastosowano wskaźniki strawialności, przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Współczynniki strawialności zastosowane do obliczenia biomasy pokarmu zjedzonego przez lisa rudego *Vulpes vulpes*, na podstawie suchej masy szczątków ofiar z odchodów drapieżnika (Jędrzejewska i Jędrzejewski 2001)

Gatunek lub grupa ofiar	Współczynnik strawialności
Małe gryzonie	23
Ssaki średniej wielkości	50
Padlina jeleniowatych	15
Hodowlane ssaki kopytne	118
Ptaki	35
Płazy i gady	18
Owady	5
Owoce	14
Inny materiał roślinny	14

Metabarcoding przeprowadzono w następującej kolejności (Fot. 4-11)

1. Izolacja DNA

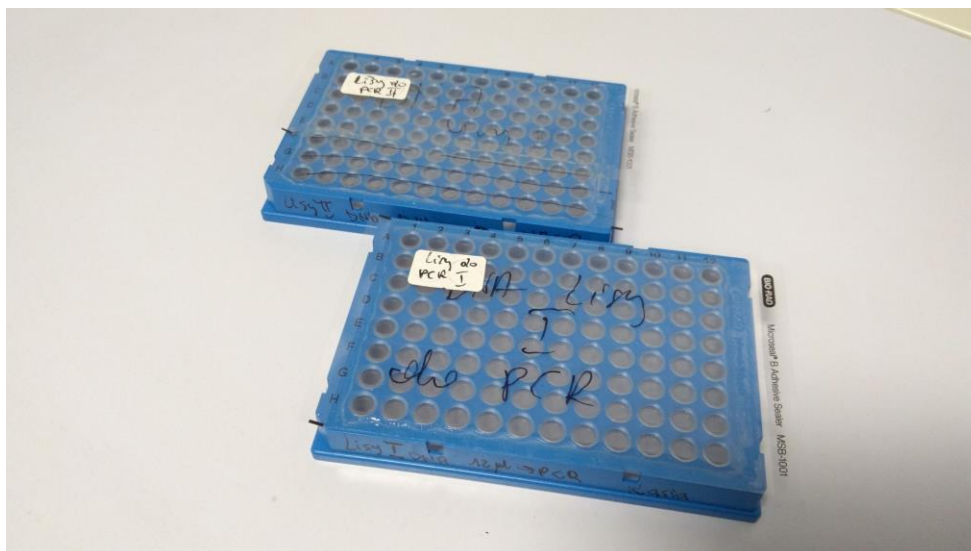
Świeże odchody lisa rudego przeznaczone do badań genetycznych zostały dostarczone do Biobanku UŁ w 96% alkoholu etylowym CZDA. Próbkę została poddana trawieniu proteinazą K (3h/56°C), a następnie wyizolowano z nich totalne DNA za pomocą zestawu DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN). Stężenie i czystość izolatów zmierzono na spektrofotometrze NanoDrop. Stężenia DNA, w zależności od struktury próbki wahały się od 2,8-297 ng/ul. Znormalizowano stężenia wszystkich izolatów do 8,33 ng/ul. Oryginalne izolaty DNA poddano biobankowaniu w -80°C.



Fot. 4. Laboratorium Pre-PCR



Fot. 5. Izolaty totalnego DNA z odchodów lisa rudego *Vulpes vulpes*



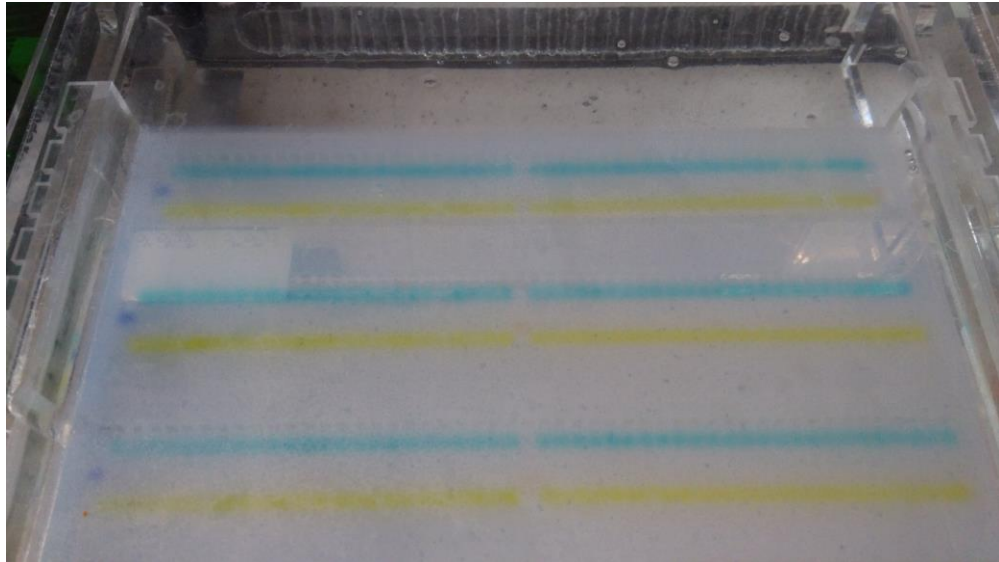
Fot. 6. Znormalizowana biblioteka DNA gotowa do reakcji PCR

2. Amplifikacja fragmentu genu *COI* i sekwencjonowanie NGS w celu analiz metagenomowych

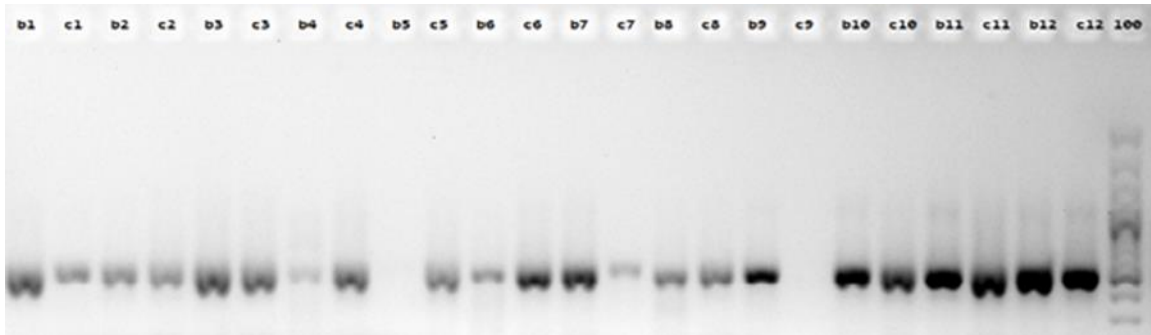
W celu metagenomowej analizy diety lisów zaprojektowano reakcję PCR z wykorzystaniem staterów o szerokim spektrum specyficzności w stosunku do DNA kręgowców: VertCOI_7194_F i Mod_RepCOI_R (Reeves et al. 2018), do których dołączono adaptory czyli sekwencje komplementarne do stererów indeksowych (Illumina. Inc), zgodnie z protokołem przygotowania bibliotek do sekwencjonowania NGS pt. „16S rRNA Metagenomic Sequencing Library Preparation”. Do reakcji PCR w termocyklerze BioRad C1000 Thermal Cycler użyto polimerazy DNA o wysokiej wierności Phanta (Vazyme Biotech. Co). Produkty reakcji o wielkości 504 bp zostały rozdzielone podczas elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym i wizualizowane za pomocą bezpiecznego dla środowiska barwnika GelRed. Produkty PCR do dalszych analiz oczyszczono za pomocą kulek magnetycznych AMPure XP Beads (Illumina. Inc). Efektywność oczyszczania sprawdzono podczas elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym, a następnie wizualizowano za pomocą bezpiecznego dla środowiska barwnika GelRed.



Fot. 7. Termocykler BioRad do reakcji PCR.



Fot. 8. Elektroforeza produktów PCR w żelu agarozowym



Fot. 9. Przykładowy elektroforegram produktów PCR do analiz metagenomowych na diety lisów rudyh *Vulpes vulpes*

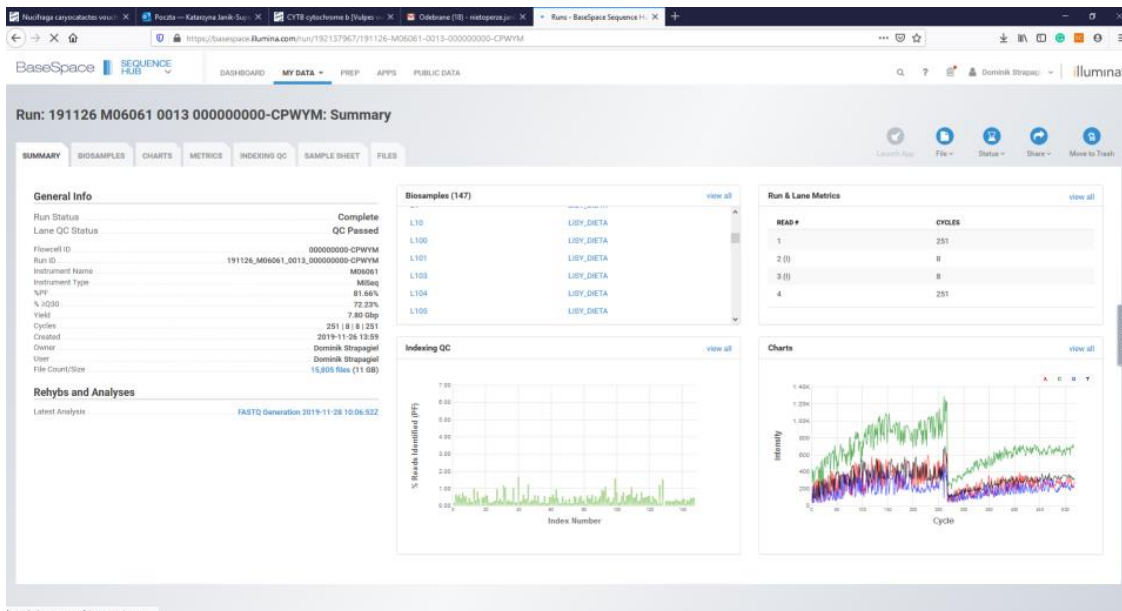
Oczyszczone produkty PCR stanowiły matrycę do indeksowego PCR z użyciem starterów zawierających w swojej sekwencji sekwencje komplementarne do adapterów dołączonych do starterów pierwszej reakcji PCR i unikalne 8-nukleotydowe sekwencje pozwalające odróżnić w sekwencjonowaniu poszczególne próbki lisów. Oznacza to, że każda biblioteka ampliconów od danego lisa miała swój niepowtarzalny układ indeksów. Do reakcji indeksowego PCR użyto polimerazy DNA o wysokiej wierności Phanta (Vazyme Biotech. Co). Produkty reakcji o wielkości 584 bp zostały rozdzielone podczas elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym i zwizualizowane za pomocą bezpiecznego dla środowiska barwnika GelRed. Produkty indeksowego PCR oczyszczono za pomocą kulek magnetycznych AMPure XP Beads (Illumina. Inc) Efektywność oczyszczania sprawdzono na 1,5% żelu żelu agarozowym a następnie zwizualizowano za pomocą bezpiecznego dla środowiska barwnika GelRed. Aby znormalizować biblioteki (wyrównać ich stężenia) wykonano pomiar intensywności świecenia prążków w świetle UV na 1,5% żelu agarozowym poprzez wykonanie zdjęcia na aparacie GelDoc firmy BioRad

Biblioteka pochodząca z danej próbki miała swój niepowtarzalny układ indeksów w celu przypisania odczytów sekwencjonowania do danej próbki odchodów. Znormalizowano oraz spulowano oczyszczone biblioteki. W celu sprawdzenia molarności puli próbek wykonano reakcję qPCR z użyciem zestawu NEBNext Library Quant Kit for Illumina (BioLabNewEngland) i na podstawie wartości Cq obliczono molarność w systemie NEBcalculator. Przygotowane biblioteki rozcieńczono, zdenaturowano i zsekwencjonowano na sekwenatorze MiSeq (Illumina, Inc., USA) w układzie 2x250 bp. W sumie poddano sekwencjonowaniu 129 bibliotek.



Fot. 10. Jeden z sekwenatorów Illumina. Inc używanych przez Pracownię Biobank UŁ

Surowe odczyty zostały przycięte w programie TrimGalore ver. 0,43. Wstępne przetwarzanie danych i kontrola jakości zostały przeprowadzone na platformie Qiime2 wer. 2019.4 z wtyczką DADA2. Przepisanie taksonomiczne według barkodu *COI* zostało wykonane na serwerze MIDORI przez narzędzie SINTAX z unikalną bazą danych *COI* aktualizowaną z iBOL i NCBI, na poziomie odcięcia 0,97 (97% komplementarności).



Fot. 11. Parametry uzyskane w trakcie sekwencjonowania na MiSeq Illumina.

3. Amplifikacja fragmentu genu *CYTB* w celu potwierdzenia pochodzenia próbki od lisa rudego *Vulpes vulpes*

W celu potwierdzenia pochodzenia próbki od lisa rudego *Vulpes vulpes* zaprojektowano specjalne, allelospecyficzne tylko do DNA lisa rudego startery i przeprowadzono reakcję PCR. Produkty reakcji o wielkości 136 bp zostały rozdzielone podczas elektroforezy w żelu agarozowym i zwizualizowane za pomocą bezpiecznego dla środowiska barwnika GelRed. Zdjęcia wykonano w świetle UV na aparacie Gel Doc firmy BioRad. Obecność prążka świadczyła o wyniku pozytywnym.

4. Amplifikacja fragmentu genu *COI* w celu potwierdzenia/wykluczenia obecności DNA głuszca *Tetrao urogallus* i cietrzewia *Lyrurus tetrrix* w odchodach lisa rudego *Vulpes vulpes*

W celu potwierdzenia/wykluczenia obecności DNA głuszca i cietrzewia w odchodach lisa rudego zaprojektowano specjalne, allelospecyficzne startery tylko do głuszca i cietrzewia na tle innych ptaków (L.tet_T.uro_R) i tylko dla głuszca (L.tet_R) i tylko do cietrzewia (T.uro_R) oraz starter Aves_F amplifikujące fragment genu *COI* i przeprowadzono reakcję PCR. Produkty reakcji o wielkościach 123 bp (głuszca i cietrzewia na tle innych ptaków) i 111bp (głuszc lub cietrzew) zostały rozdzielone podczas elektroforezy w żelu agarozowym i zwizualizowane za pomocą bezpiecznego dla środowiska barwnika GelRed. Zdjęcia wykonano w świetle UV na aparacie Gel Doc firmy BioRad. Obecność prążka świadczyła o wyniku pozytywnym.

Wyniki

Analiza mikroskopowa oznaczalnych niestrawionych składowych diety lisa wskazuje, że podstawą diety drapieżnika w Tatrzańskim Parku Narodowym są gryzonie Rodentia z rodzaju norników *Microtus* (Tab. 2). Norniki (ze śnieżnikiem tatrzańskim) zostały oznaczone w 76 próbach i stanowią 36.21% biomasy. W pokarmie lisa wyróżnia się udział charakterystycznych przy oznaczaniu norników: darniowego *M. subterraneus* i tatrzańskiego *M. tatricus*, które wskazują o położeniu terenów żerowiskowych lisa na polanach i halach tatrzańskich. Brak materiału kostnego nie pozwala na dokładniejsze oznaczenie tych gatunków. Lisy zjadały w badanym okresie również padlinę jeleniowatych oraz kozicy tatrzańskiej wykorzystując zapewne ofiary wilków.

Znaczny udział zarówno pod względem frekwencji, jak i biomasy stanowią w analizowanym materiale ptaki. Wypreparowane pióra nie posiadały jednak cech, które pozwalałyby oznaczyć gatunek. W większości były to prawdopodobnie osobniki młode. W kilku przypadkach pióra ptaków zostały stwierdzone dopiero po analizie mikroskopowej materiału. W kilku próbach stwierdzono również jaszczurki, łatwe do oznaczenia po obecności niestrawionych charakterystycznych łusek. Niemniej oznaczenie ich do gatunku było niemożliwe. Dalsze analizy genetyczne wykazały, że DNA jaszczurki znajdowało się również w próbach, gdzie łuski nie były widoczne.

W analizowanym materiale stwierdzono wysoką frekwencję bezkręgowców, które stanowią jednak niewielki odsetek ogólnej biomasy. Interesujące są stwierdzenia gniazd błonkówek oraz w jednym przypadku larw chrząszczy, które stanowiły 100% analizowanej próby. Oznaczenie gatunku wymaga dalszych analiz. W materiale stwierdzono również owoce i nasiona, a także fragmenty folii i papieru wskazujące na żerowanie na odpadkach.

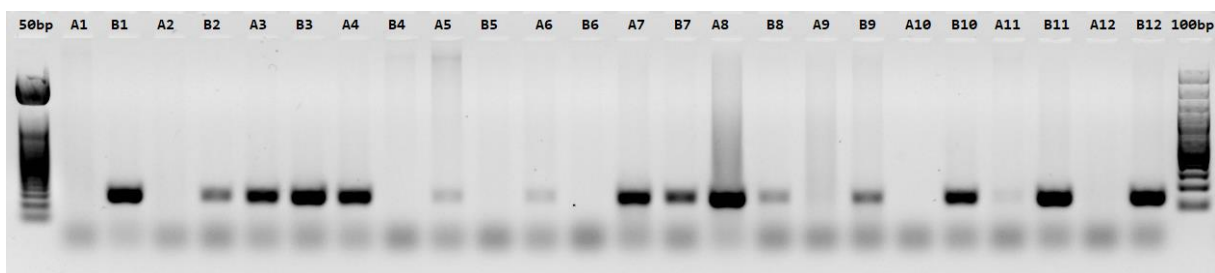
Tabela 2. Skład pokarmu lisa rudego *Vulpes vulpes*/ kuny leśnej *Martes martes* w Tatrzańskim Parku Narodowym w 2019 roku (F – frekwencja, B – biomasa) oznaczony standardową metodą oznaczania przy pomocy kluczy do oznaczania gatunków

Gatunek	Frekwencja F	F%	B%
jeleniowate Cervidae	8	5.23	5.05
kozica tatrzańska <i>Rupicapra r. rupicapra</i>	1	0.65	0.48
ssaki nieoznaczone	5	3.26	6,23
bóbr europejski <i>Castor fiber</i>	1	0.65	0.26
orzyszka leszczynowa <i>Muscardinus avellarius</i>	2	1.31	0.34
śnieżnik europejski <i>Chionomys nivalis</i>	2	1.31	1.08
norniki nieoznaczone <i>Microtus</i> sp	54	35.29	30.32
nornik bury <i>Microtus agrestis</i>	4	2.61	1.37
nornik zwyczajny <i>Microtus arvalis</i>	2	1.31	0.39
nornik darniowy/tatrzański <i>M. subterraneus/tatricus</i>	14	9.15	3.05
myszarki nieoznaczone <i>Apodemus</i> sp.	11	7.19	2.10
nornica ruda <i>Clethrionomys glareolus</i>	3	1.96	1.19
nietoperze Chiroptera	1	0.65	0.41
zwierzęta hodowlane	1	0.65	2.59
ptaki nieoznaczone Aves	35	22.88	17.32
jaszczurki nieoznaczone <i>Lacerta/Zootoca</i> sp.	4	2.61	0.44
chrząszcze nieoznaczone Coleoptera	42	27.45	1.22
biegaczowate nieoznaczone Carabidae	16	10.46	0.39
prostoskrzydłe nieoznaczone Orthoptera	7	4.58	0.09
gniazdo błonkówek Hymenoptera	9	5.88	1.10
larwy chrząszczy Coleoptera	1	0.65	0.07
borówka czarna <i>Vaccinium myrtillus</i>	47	30.72	7.02
borówka brusznica <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	2	1.31	0.43
malina właściwa <i>Rubus idaeus</i>	12	7.84	0.85
jabłka <i>Malus</i> sp.	8	5.23	2.09
śliwka <i>Prunus</i> sp.	1	0.65	0.02
kukurydza <i>Zea mais</i>	4	2.61	0.42
inny materiał roślinny: trawa, liście, fragmenty kory	36	23.53	14.32
papier, folia	9	5.88	



Fot. 12. Resztki padliny owcy znalezione przy norze lisa *Vulpes vulpes* w Tatrzańskim Parku Narodowym (Fot. J. Cichocki)

Analizy genetyczne wskazują, że ze 153 analizowanych prób 24 to odchody kuny leśnej *Martes martes* (Fot. 13) a 109 lisa rudego *Vulpes vulpes*. Nie oznaczono przynależności gatunkowej 20 prób. Metody genetyczne pozwoliły na obecnym etapie na oznaczenie w materiale pochodzącym z odchodów, nieoznaczalnych standardowymi metodami gatunków ryb, gadów, ptaków, ssaków i owadów (Tab. 2).



Fot. 13. Przykładowy żel potwierdzający, że analizowane próby zawierają DNA lisa rudego *Vulpes vulpes*

Tabela 3. Skład pokarmu lisa rudego *Vulpes vulpes*/kuny leśnej *Martes martes* w Tatrzańskim Parku Narodowym w 2019 roku (F – frekwencja) oznaczony metodami analizy DNA ofiar w 133 próbach (jako wynik pozytywny przyjęto minimalnie > 1.5% sekwencji)

Gatunek	Frekwencja F	F%
jeleń szlachetny <i>Cervus elaphus</i>	3	2.26
sarna europejska <i>Capreolus capreolus</i>	1	0.75
kozica tatrzańska <i>Rupicapra r. rupicapra</i>	4	3.01
dzik euroazjatycki <i>Sus scrofa</i>	19	14.29
kret europejski <i>Talpa europaea</i>	19	14.29
ryjówka aksamitna <i>Sorex araeus</i>	15	11.28
ryjówka malutka <i>Sorex minutus</i>	2	1.50
wiewiórka pospolita <i>Sciurus vulgaris</i>	1	0.75
bóbr europejski <i>Castor fiber</i>	21	15.79
orzecznicza leszczynowa <i>Muscardinus avellarius</i>	4	3.01
śnieżnik europejski <i>Chionomys nivalis</i>	5	3.76
nornik bury <i>Microtus agrestis</i>	16	12.03
nornik zwyczajny <i>Microtus arvalis</i>	2	1.50
nornik darniowy/tatrzański <i>M. subterraneus/tatricus</i>	32	24.06
nornica ruda <i>Clethrionomys glareolus</i>	4	3.01
myszarka leśna <i>Apodemus flavicollis</i>	1	0.75
karczownik górski <i>Arvicola scherman</i>	3	2.26
świstak tatrzański <i>Marmota m. latirostris</i>	4	3.01
wilk szary <i>Canis lupus</i> / pies <i>Canis familiaris</i>	1	0.75
niedźwiedź brunatny <i>Ursus arctos</i>	9	6.77
zwierzęta hodowlane – bydło <i>Bos taurus</i>	2	1.50
ssaki Mammalia nieoznaczone	6	4.51
DNA człowieka	8	6.02
pierwiosnek zwyczajny <i>Phylloscopus collybita</i>	1	0.75
gil zwyczajny <i>Pyrrhula pyrrhula</i>	1	0.75
strzyżyk zwyczajny <i>Troglodytes troglodytes</i>	1	0.75
płochacz pokrzywnica <i>Prunella modularis</i>	11	8.27

pliszka górska <i>Motacilla cinerea</i>	1	0.75
drozd śpiewak <i>Turdus philomelos</i>	3	2.26
drozd obrożny <i>Turdus torquatus</i>	1	0.75
pokrzewka czarnołbista <i>Sylvia atricapilla</i>	3	2.26
rudzik zwyczajny <i>Erithacus rubecula</i>	6	4.51
słonka <i>Scolopax rusticola</i>	1	0.75
przepiórka <i>Coturnix coturnix</i>	2	1.50
cietrzew <i>Lyrurus tetrix</i>	10	7.52
kura domowa <i>Gallus gallus</i>	2	1.50
indyk <i>Meleagris gallopavo</i>	1	0.75
kaczka krzyżówka <i>Anas platyrhynchos</i>	1	0.75
jaszczurka żyworódka <i>Zootoca vivipara</i>	12	9.02
okoniokształtne Perciformes nieoznaczone	5	3.76
stawonogi Arthropoda nieoznaczone	13	9.77
owady Insecta nieoznaczone	33	24.81
<i>Dolichovespula</i> sp.	10	7.52

Oprócz gatunków wymienionych w Tabeli 2 w badanych odchodach znaleziono śladowe ilości DNA (do 1% sekwencji): biegacz zielonozłoty *Carabus auronitens*, biegacz fioletowy *Carabus violaceus*, *Catops coracinus*, paciepnica korzeniówka *Apamea monoglypha*, *Dermestes lardarius*, *Trogoderma yunnaeensis*, plujka pospolita *Calliphora vicina*, *Scathophaga furcata*, *Scatopsiara atomaria*, *Plutella xylostella*, żaba trawna *Rana temporaria*, gołąb skalny *Columba livia*, jastrząb zwyczajny *Accipiter gentilis*, głuszec *Tetrao urogallus*, modraszka zwyczajna *Cyanistes caeruleus*, nocek Brandta *Myotis brandtii*.

Cietrzewia stwierdzono w 10 próbach. W jednej próbie stwierdzono obecność śladowych ilości DNA głuszca .

Tabela 4. Stwierdzenia materiału DNA cietrzewia (próby 1-10) (minimum > 1.5% sekwencji) oraz głośca (próba 11, śladowe ilości DNA) w analizowanym materiale z Tatrzańskiego Parku Narodowego

L.p.	Data	Lokalizacja	Numer próby	Gatunek drapieżnika
1.	2019-06-05	Pańszczycki potok	L13	kuna leśna
2.	2019-06-05	Polana Pańszczyca	L14	lis rudy
3.	2019-06-06	Gęsi	L16	kuna leśna
4.	2019-09-10	oddz 12	L145	lis rudy
5.	2019-09-15	Kopy Sołtysie	L147	lis rudy
6.	2019-06-09	82	L26	lis rudy
7.	2019-06-22	Ułanowa	L33	kuna leśna
8.	2019-07-12	nad Esem	L55	lis rudy
9.	2019-07-22	oddz. 5 Nad Hurkotną	L84	lis rudy
10.	2019-07-22	Dolina Białego	L85	lis rudy
11.	2019-07-22	oddz. 4 Kiczora	L83	kuna leśna

Tabela 5. Lokalizacja prób odchodów lisa rudego i kuny leśnej, w których wykazano obecność materiału DNA człowieka w ilości przekraczającej przypadkowe zanieczyszczenia w trakcie przygotowywania prób do analiz i wskazującej na żerowanie

L.p.	Data	Lokalizacja	Numer próby
1.	2019-05-10	Kondratowa - Padaki	L01
2.	2019-07-26	Broniarski	L91
3.	2019-07-28	Fornalka	L97
4.	2019-07-26	oddz. 85	L98
5.	2019-07-29	Koziarczyska	L99
6.	2019-07-26	Koziarczyska	L92
7.	2019-05-21	Dol. Pięciu Stawów	L09
8.	2019-07-22	Dolina Białego	L85

Tabela 6. Lokalizacja prób odchodów lisa rudego i kuny leśnej, w których wykazano obecność materiału DNA niedźwiedzia brunatnego w ilości wskazującej na żerowanie na padlinie

Lp	Data	Lokalizacja	Numer próby
1.	2019-06-12	Uplaziański Żleb	L125
2.	2019-08-04	Herbik	L126
3.	2019-08-02	Psia Trawka	L127
4.	2019-08-04	Dol. Goryczkowa	L129
5.	2019-08-04	Sucha Woda	L131
6.	2019-08-04	Sucha Woda	L132
7.	2019-08-04	Sucha Woda	L134
8.	2019-09-15	oddz. 87	L150
9.	2019-08-09	Sucha Woda	L118

Podsumowanie

1. Przeanalizowano skład 153 prób odchodów drapieżników z Tatrzańskiego Parku Narodowego. Analizy genetyczne wykazały, że 109 to odchody lisa rudego, a 24 to odchody kuny leśnej. Nie oznaczono przynależności gatunkowej 20 prób.
2. Wykorzystanie standardowych metod pozwoliło na oznaczenie materiału roślinnego np. owoców oraz wielu gatunków zwierząt.
3. Analizy genetyczne wskazują, że oznaczanie gatunków jedynie na podstawie analizy materiału kostnego i włosów jest obarczone błędem. W analizowanym materiale są próby, w których stwierdzane są metodami analizy DNA trzy różne gatunki drobnych ssaków, gdy analiza standardowymi metodami pozwala na wykazanie tylko jednego gatunku. Obydwie stosowane metody analizy diety drapieżników uznawane są za komplementarne, co potwierdzają również niniejsze badania
4. Metody genetyczne pozwoliły na oznaczenie zarówno ptaków, jak i ssaków, również w próbach, w których nie było oznaczalnych szczątków, wskazujących na tę grupę systematyczną. Zawartość materiału genetycznego w próbach również była bardzo zróżnicowana.
5. W diecie stwierdzono również znaczny udział ptaków, których oznaczenie standardowymi metodami było niemożliwe. Analiza budowy piór wskazuje, że były to młode osobniki. Dopiero jednak zastosowanie metod analizy DNA dało kompletny obraz, na jakich gatunkach żerują lis i kuna leśna.
6. Cietrzew został stwierdzony w 10 próbach, z tego 3 były to odchody kuny leśnej, a 7 odchody lisa.
7. Stwierdzono śladowe ilości DNA głuszca (1 próba L83 - odchody lisa).

8. W analizowanym materiale oznaczono gatunki typowo tatrzańskie: świstaka tatrzańskiego, kozicę tatrzańską, śnieżnika tatrzańskiego.
9. Przy przygotowaniu materiału do publikacji zostanie również zweryfikowane w jakim stopniu lis rudy i kuna leśna występują w próbach jako pokarm drugiego drapieżnika. Problem ten jest trudny do weryfikacji.
10. Analizy genetyczne znacznie poszerzyły zakres wiedzy o składzie pokarmu tatrzańskich drapieżników. Wskazują, że są one niezbędne do prawidłowego oszacowania skomplikowanych zależności troficznych pomiędzy gatunkami drapieżników i ofiar w Tatrach.
11. Wyniki analiz genetycznych w przygotowywanej publikacji mogą się nieznacznie różnić w zależności od wyznaczonego udziału materiału genetycznego, który zostanie uznany za wystarczający do stwierdzenia, czy gatunek był ofiarą drapieżnika. W niniejszym raporcie przyjęto stosunkowo wysoki udział 1.5% lub więcej. Wynika to z zanieczyszczenia prób, związanego ze zbieraniem materiału w trudnych warunkach terenowych. Niemniej utrudnia to proces weryfikacji wyników.
12. Wyniki badań wskazują, że zarówno lis rudy, jak i kuna leśna polują na tatrzańskie gatunki kuraków. Na obecnym etapie nie można stwierdzić, że ma to negatywny wpływ na ich populacje. Zarówno lis rudy, jak i kuna leśna nie wykazują wzrostu liczebności populacji. Problem ten z pewnością wymaga dalszego monitorowania. Niniejsze opracowanie może wspomóc wypracowanie metod monitoringu interakcji pomiędzy drapieżnikami, a ich ofiarami na terenach chronionych i w odniesieniu do ochrony gatunków zagrożonych wyginięciem.

Literatura

1. Borkowski J. 1994. Food composition of red fox in Tatra National Park. *Acta theriologica* 39: 209-214.
2. Dziurdzik B. 1973. Klucz do oznaczania włosów ssaków Polski. *Acta zoologica cracoviensia* 18: 73-91.
3. Goszczyński J. 1995. Lis. Monografia przyrodniczo-łowiecka. Oikos. Warszawa

4. Hoffmann M., Sillero-Zubiri C. 2016. *Vulpes vulpes*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T23062A46190249. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T23062A46190249.en>.
5. Jędrzejewska B., Jędrzejewski W. 2001. Ekologia zwierząt drapieżnych Puszczy Białowieskiej. PWN. Warszawa
6. Reeves LE, Gillett-Kaufman JL, Kawahara AY, Kaufman PE 2018. Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals. PLoS Negl Trop Dis 12(8): e0006767. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006767>
7. Pławilszczikow N. 1968. Klucz do oznaczania owadów. PWRiL. Warszawa.
8. Pucek Z. (red.), 1984. Klucz do oznaczania ssaków Polski. PWN, Warszawa.
9. Sari A., Arpacik A. 2018. Morphological hair identification key of common mammals in Turkey. Applied Ecology and Environmental Research 16(4):4593-4603.
10. Teerink B.J. 1991. Atlas and identification key hair of westeuropean mammals. Cambridge University Press. Cambridge.
11. Wegge P., Kastdalen L. 2007. Pattern and causes of natural mortality of capercaillie, *Tetrao urogallus*, chicks in a fragmented boreal forest. Annales Zoologici Fennici 44(2): 141-151.
12. https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

Załączniki

Załącznik 1. Miejsce i data zbioru odchodów lisa rudego *Vulpes vulpes* w TPN

Data zbioru	Miejsce zbioru	Numer próby
2019-03-04	Wąwóz Kraków	L23
2019-04-15	Kondracki W	L24
2019-04-19	szlak na Polanę Uplaz	L25
2019-04-24	Wawrzeczkowa	L22
2019-04-25	Dol. Za Mnichem	L21
2019-05-10	Kondratowa - Padaki	L01
2019-05-10	Kondratowa - Skrzyżowanie	L02
2019-05-20	Świńska Przełęcz	L03
2019-05-20	Kopa Kondracka	L04
2019-05-20	Litworowa	L05
2019-05-20	Mała Łąka	L06
2019-05-21	Hala Gąsienicowa	L07
2019-05-21	Waksmundzka - Pośrednia Równica	L08
2019-05-21	Dol. Pięciu Stawów	L09
2019-05-27	Ciemniak	L10
2019-05-31	Jarząbcza	L11
2019-06-05	Za Mnichem	L12
2019-06-05	Pańszczycki potok	L13
2019-06-05	Polana Pańszczyca	L14
2019-06-07	Żandarmeria	L15
2019-06-06	Gęsi	L16
2019-06-10	pod Kosturem	L17
2019-06-10	Świstówka	L18
2019-06-12	Pyszna	L19
2019-06-14	Niżna równień Goryczkowa	L20
2019-06-09	82	L26
2019-06-14	Łęgi	L27
2019-06-18	Mała Łąka	L28
2019-06-18	Wyżnie	L29
2019-06-18	Niżnia Świstówka	L30
2019-06-20	Grześ	L31
2019-06-22	Mała Łąka	L32
2019-06-22	Ułanowa	L33
2019-06-22	Grzybowiec	L34
2019-06-22	Grzybowiec	L35
2019-06-25	Skoruśniak	L36
2019-06-25	Czerwony Grzbiet	L37
2019-06-25	Nad Wantą	L38
2019-06-25	Zahradziska	L39
2019-06-25	Las Gąsienicowy	L40
2019-06-25	Dubrawiska	L41
2019-06-25	Potok Waksmundzka	L42
2019-06-25	Wyżnia Świstówka	L43

2019-07-08	Dolina Roztoki	L44
2019-07-08	Odz. 113	L45
2019-07-08	Odz. 110	L46
2019-07-08	Odz. 110	L47
2019-07-12	Kasprowy - trawers	L48
2019-07-12	Kasprowy - trawers	L49
2019-07-12	nad Cichą	L50
2019-07-12	Kocioł Goryczkowy	L51
2019-07-12	Goryczkowa Niżnia	L52
2019-07-12	Goryczkowa Niżnia	L53
2019-07-12	Goryczkowa Niżnia	L54
2019-07-12	nad Esem	L55
2019-07-12	Hala Gąsienicowa	L56
2019-07-12	Hala Gąsienicowa	L57
2019-07-12	Hala Gąsienicowa	L58
2019-07-12	Hala Gąsienicowa	L59
2019-07-13	Mokra Jama	L60
2019-07-13	Mokra Jama	L61
2019-07-13	Mokra Jama	L62
2019-07-13	Mokra Jama	L63
2019-07-13	Troiśniak	L64
2019-07-13	Troiśniak	L65
2019-07-13	Troiśniak	L66
2019-07-14	Litworowy	L67
2019-07-14	Pośrednia Turnia	L68
2019-07-14	Agrafka	L69
2019-07-16	Wąwóz Kraków	L70
2019-07-18	na drodze nad esem	L71
2019-07-18	Dol. Goryczkowa	L72
2019-07-18	Goryczkowa Czuba	L73
2019-07-18	Suche Czuby	L74
2019-07-18	Kondratowa	L75
2019-07-19	Hala Gąsienicowa	L76
2019-07-21	Pol. Chochołowska	L77
2019-07-21	pod Bobrowcem	L78
2019-07-15	Dolna stacja kolejki Gąsienicowa	L79
2019-07-19	oddz. 88	L80
2019-06-29	oddz. 87	L81
2019-07-15	oddz. 86	L82
2019-07-22	oddz. 4 Kiczora	L83
2019-07-22	oddz. 5 Nad Hurkotną	L84
2019-07-22	Dolina Białego	L85
2019-07-22	Dolina Sucha	L86
2019-07-25	Nartostrada niedaleko Żlebu Roja	L87
2019-07-25	Kryta Dolina	L88
2019-07-25	Nad Juraniową	L89
2019-07-25	Nartostrada - Kuźnice	L90
2019-07-26	Broniarski	L91

2019-07-26	Koziarczyska	L92
2019-07-26	Sucha Woda	L93
2019-07-26	Sucha Woda	L94
2019-07-26	Miętusia Dol.	L95
2019-07-26	Miętusia Dol.	L96
2019-07-28	Fornalka	L97
2019-07-26	oddz. 85	L98
2019-07-29	Koziarczyska	L99
2019-07-29	Sucha Woda	L100
2019-07-29	Sucha Woda	L101
2019-07-29	Zielonka	L102
2019-07-26	Kondradzka Rówień	L103
2019-07-27	Goły Wierch	L104
2019-07-27	Zielonka	L105
2019-08-02	Padaki	L106
2019-08-06	oddz 12	L107
2019-08-06	Hala Gąsienicowa	L108
2019-08-17	pod Fornalką	L109
2019-08-18	nad Pol. Ornaczańską	L110
2019-08-09	Sucha Woda	L111
2019-08-09	Sucha Woda	L112
2019-08-09	Sucha Woda	L113
2019-08-09	Sucha Woda	L114
2019-08-09	Sucha Woda	L115
2019-08-09	Sucha Woda	L116
2019-08-09	Sucha Woda	L117
2019-08-09	Sucha Woda	L118
2019-08-19	Świstówka	L119
2019-08-19	Włosienica	L120
2019-08-17	oddz. 4 Kiczora	L121
2019-08-21	Murowaniec	L122
2019-08-21	Gawra	L123
2019-08-21	Las Gąsienicowy	L124
2019-06-12	Uplaziański Żleb	L125
2019-08-04	Herbik	L126
2019-08-02	Psia Trawka	L127
2019-08-02	Psia Trawka	L128
2019-08-04	Dol. Goryczkowa	L129
2019-08-04	Psia Trawka	L130
2019-08-04	Sucha Woda	L131
2019-08-04	Sucha Woda	L132
2019-08-04	Sucha Woda	L133
2019-08-04	Sucha Woda	L134
2019-08-30	Fornalka	L135
2019-08-25	Wyźnia Kondradzka Przęłęcz	L136
2019-08-22	Oddz. 41	L137
2019-09-10	Uhrocie Kasprowe	L138
2019-09-10	Uhrocie Kasprowe	L139

2019-09-10	Hala Gąsienicowa	L140
2019-09-07	Giewont	L141
2019-09-07	Piekiełko	L142
2019-09-07	Piekiełko	L143
2019-09-07	oddz. 92	L144
2019-09-10	oddz 12	L145
2019-09-10	oddz 12	L146
2019-09-15	Kopy Sołtysie	L147
2019-09-12	oddz. 85	L148
2019-09-14	oddz. 79	L149
2019-09-15	oddz. 87	L150
2019-09-26	Dol. Za Mnichem	L151
2019-09-26	Szpiglasowe Kopki	L152
2019-09-26	5 Stawów	L153
