

תזונת התן הזהוב (*Canis aureus*) בדרום ישראל: אנליזה של תוכן קיבה.

Diet of the golden jackal (*Canis auerus*) in Southern Israel:

stomach content analysis.

עבודת הגמר של התלמיד: תומר נסימיאן Tomer Nessimyan

מתוכנן לסיים את לימודיו לתואר DVM בשנת 2012

כמילוי חלקי של הדרישות לשם קבלת תואר דוקטור לרפואה וטרינרית

מטעם ביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט של האוניברסיטה העברית בירושלים.

בהדרכת: דר' גילה כחילה בר-גל, ביה"ס לרפואה וטרינרית _____

דר' רוני קינג, רשות הטבע והגנים _____

ביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט, הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית,

האוניברסיטה העברית בירושלים.

ת.ד 12 רחובות 76100

06.05.2012

הבעת תודה

למחקר זה תרמו רבים וטובים, להם רציתי להודות מקרב לב.

ראשית ברצוני להודות למנחיי - דר' גילה כחילה בר-גל ודר' רוני קינג על ההנחיה, העצות והתמיכה לכל אורך המחקר, גם ברגעים של קושי.

לפקחי רשות הטבע והגנים – עומרי גולמן, מרק כץ ואוהד יהלומי על האינפורמציה, הידע מהשטח והסיוע בהשגת הדגימות לעבודה זו.

לצוות המעבדה התומך של דר' גילה כחילה בר-גל: דר' אלה שיימן, ליה הדס, טלי מגורי-כהן ובמיוחד לשגיא פולני שסייע לי רבות.

למומחים שהדריכו אותי וסייעו לי בביצוע הזיהוי המורפולוגי: דר' רבקה רבינוביץ, דר' יהושוע מילגרם, דר' סיימון נמצוב, אוהד הצופה ופרופ' שחל אבו.

לדר' יואב מוטרו על העצות והעזרה.

אחרונה חביבה, תודה לאשתי יעל שתמיד נמצאת לצידי.

תקציר

בישראל, התן הזהוב (*Canis auerus*) הסתגל היטב לתנאים הקיימים בשטחים חקלאיים ובשולי אוכלוסייה אנושית צפופה. כיום התן הזהוב מוגדר כמין מתפרץ ותצפיות פקחי רשות הטבע והגנים מעלות כי שכיחות הופעתו עולה לאחרונה גם בדרום המדינה. משאבי קיום שמקורם בפעילות האדם מובילים להגדלה מלאכותית של כושר הנשיאה בשטח מעבר לכושר הנשיאה הטבעי של הסביבה. אותם משאבים נחשבים כגורם מרכזי להתפתחות אוכלוסיות יתר של מיני טורפים כגון התן הזהוב. השלכות תופעה זו הינן נרחבות, החל בערעור יציבות המערכת הטבעית, דחיקה תחרותית של טורפים אחרים, טריפת מינים אחרים וכלה בעליה בהיקף נזקי חקלאות וחשש מהעברת מחלות מדבקות לאדם ולחי. רשות הטבע והגנים מנסה למנוע את הגידול הבלתי מבוקר באוכלוסיית התנים בשטח המחקר על ידי שיפור הסניטציה באיזור ועושה שימוש גם בדילול באמצעות ירי. בכדי להבין את השלכות תופעת ההתפשטות, עלה הצורך בחקר תזונת התנים בדרום ישראל.

מחקר זה התמקד בתזונתו של התן באיזור יער יתיר ורמת הנגב בין השנים 2008 ל- 2010. במחקר בוצע אפיון מורפולוגי ואפיון גנטי תוך שימוש ב-3 פרימרים אוניברסלים, לתוכן קיבה של 47 תנים שדוללו ע"י פקחי רשות הטבע והגנים בשטח המחקר. השילוב בין שתי שיטות הזיהוי איפשר לזהות פריטי מזון שמקורם בחי עד לרמת המין (Species). ב-12 מתוך 47 קיבות התנים (שכיחות של 25.5%) לא נמצא מעכל כלל. ב- 40% מהקיבות נמצאו שרידי אשפה והיא נמצאה כקטגוריית המזון העיקרית. שאר קטגוריות המזון הנפוצות היו יונקי בר (34.3%), יונקים מבוייתים (34.3%), פירות (28.6%) ועופות משק (22.3%). פריטי מזון המושפעים מפעילות אנטרופוגנית ישירה נמצאו ב-27 קיבות מתוך 35 (שכיחות של 77.1%). הדרבן המצוי *(Hystrix indica)* נמצא כמין בע"ח הנפוץ ביותר בתכני הקיבה. לא נמצאו קשרים מובהקים בין גורמי רקע לבין תזונת התנים, למעט קשר בין גיל צעיר לבין תזונה מאשפה *(P=0.028)*.

שילוב הזיהוי המורפולוגי עם הזיהוי הגנטי של תוכני הקיבות, איפשר לבצע זיהוי טקסונומי מדוייק לפריטי מזון רבים מהחי, באופן שלא בוצע עד כה במחקרים דומים שעסקו בתזונת התן. הזיהוי הגנטי של תוכן הקיבה נמצא מאוד מאתגר בהתחשב בכך שרמת שימור הדנ"א בו ירודה, מתקיימים בו חומרים מעכבים והוא מכיל גם דנ"א עצמי שמקורו באפיתל הקיבה.

תוצאות המחקר הוסיפו מידע חשוב על תזונתו של התן בדרום ישראל והדגימו היטב את הקשר בין תזונה המושפעת מפעילות אנושית לבין התפשטותם של התנים דרומה. מתוך תוצאותיו של המחקר ניתן להעריך כי שיפור בסניטציה באיזור, סילוק פסדים ואשפה עשויי לתרום רבות להפחתת התפשטותם של התנים לדרום ישראל.

Abstract

In Israel, the golden jackal (*Canis auerus*) has adapted well to the conditions generated by agricultural areas and the margins of dense human populations. Currently the Israeli golden jackal is considered as an overabundant species and its distribution is recently expanding into southern Israel. An increase in the availability of resources as part of human activity, lead to an artificial increase in the environment's carrying capacity. These resources are a key factor to over- population development of certain mammalian predators, such as the golden jackal. The implications of this phenomenon are extensive, ranging from undermining the stability of natural environment, competitive exclusion of other predators, predation of other species, increase in agriculture damages and fear of transmitting infectious diseases to animals and human. The Nature Reserves Authority is trying to control the rising jackal population by improving sanitation and the use of shooting for population dilution. In order to assess the implications of expanding dispersal phenomenon, it was essential to study the nutrition of the jackal in its associated areas.

The diet of the golden jackal (*Canis auerus*) was studied in this research, between the years 2008 to 2010 in Ramat Negev and Yatir forest at southern Israel. The stomach contents of 47 jackals, culled in the study area, were classified morphologically and genetically, using three universal primers. The combination of these two detection methods allowed to identify feed derived from fauna down to the level of species. 12 of 47 stomachs (prevalence of 25.5%) showed no digests. In 40% of the remaining stomachs were remains of human waste and it was found as the main food category. Other common food types included wild mammals (34.3%), domestic mammals (34.3%), fruits (28.6%) and poultry (22.3%). Food items influenced by direct human activity found in 27 of 34 stomach contents (77.1%). The Indian porcupine (*Hystrix indica)* was found to be the most common animal in the jackal's diet. No significant relationships were found between the background factors and diet of jackals, except for a relationship between young age and foraging for trash (*P=0.028*).

The combination of both morphological and genetically based identifications allowed a precise taxonomic identification for many feeds, in a manner never seen in other studies of the golden jackal's diet. The genetic identification was found to be very challenging due to poor DNA conservation, the presence of PCR inhibitors and self–gastric epithelial origin DNA.

The results of the current add important insight about the jackal's diet in southern Israel and illustrate the relationship between diet influenced by human activity and the jackal's expanding dispersal phenomenon. From these results, one can estimate that removal of waste and garbage can contribute to a sustainable solution for the jackal's dispersal problem in south Israel.

תוכן עניינים

1. רקע מדעי 6

1.1 מבוא 6

1.2 תזונת התן הזהוב 8

1.3 שיטות מורפולוגיות וגנטיות לזיהוי טקסונומי של טרף 9

1.4 השערות העבודה ומטרותיה 12

2. חומרים ושיטות 13

2.1 שטח המחקר 13

2.2 קביעת גודל המדגם 14

2.3 איסוף הדגימות 15

2.4 ניקוי ומיון תכולות הקיבה 15

2.5 איפיון מורפולוגי 16

2.6 איפיון גנטי 17

2.7 ניתוח סטטיסטי 21

3. תוצאות 22

4. דיון 33

5. רשימת ספרות 38

6. נספח 1 – איפיון מורפולוגי 42

7. נספח 2- איפיון גנטי 43

1. רקע מדעי

1.1. מבוא

בעת העתיקה התן הזהוב (*Canis aureus*) נצפה רבות בקרבת בתי מטבחיים ואתרי קבורה. יתכן שהקשר הסמלי הבולט בין התנים למוות היה זה שהביא את המצרים הקדמוניים לסגוד לאליל בעל ראש התן – אנוביס, אל המוות ומגן המתים. בפועל הימצאותם של התנים בכל מקום בו הם עשויים למצוא מזון קשורה יותר מכל לתזונתם האופורטוניסטית (1). משאבי קיום כתוצאה מפעילות אנושית כדוגמת פסדים (פגרי בע"ח), מזבלות, סבך ומסתור הנוצרים בעקבות זרימת מי שופכין, משפיעים על צפיפות אוכלוסיות של בעלי חיים ומגדילים באופן מלאכותי את כושר הנשיאה בשטח. התנאים המשופרים תומכים באוכלוסיה שהשטח צר מלכלכלה ועל כן פרטים מהאוכלוסיה מתפשטים לשטחים סמוכים (2). חלק מאותם מינים, כדוגמת התן הזהוב, הופכים למין מתפרץ- מין מקומי, שאוכלוסייתו עולה באופן ניכר בתוך תחום תפוצתו ומגיעה לצפיפויות גבוהות ולכן הוא מתפשט מעבר לתחום תפוצתו המקורי, בדרך כלל בהשפעת האדם (3). מצב זה פוגע ביציבות המערכת האקולוגית, מהווה איום על קיומן של אוכלוסיות נטרפים טבעיות כתוצאה מלחץ טריפה לא מאוזן, מאפשר דחיקה תחרותית של מינים המתחרים עמו על אותם משאבים, מעלה את הסיכון להעברת מחלות, מגביר את הקונפליקט עם האדם וגורם לעליה בהיקף נזקי חקלאות (2).

התן הזהוב שייך למשפחת הכלביים והינו בעל חיים שגודלו בינוני. משקלו הממוצע הינו 12-7 ק"ג ואורך גופו הממוצע כ- 75 ס"מ (3). תפוצתו בעולם: מדרום – מזרח אירופה (הבלקן, יוון) מזרחה עד הודו, סרי לנקה וברומה, וכן דרומה עד דרום חצי-האי ערב. התנים הזהובים שבצפון אפריקה ובמזרחה שונים בצורתם מאלה שבאירופה ובאסיה, אך בכל זאת משוייכים טקסונומית למין *Canis aureus* (4).

התן הזהוב, על פי הספרות בישראל, נפוץ בכל צפון הארץ ומרכזה, עם חדירות לנגב עד שדה בוקר (4). התן פעיל בעיקר בלילה, אך גם בשעות אחרי הצהריים או בשעות הבוקר המוקדמות. התנים הם בעלי חיים חברתיים. בעונת הרבייה הם חיים בזוגות, ובשאר ימות השנה הם חיים במשפחות. זמינות של משאבים ומזון הינה גורם משפיע על המבנה החברתי של אוכלוסיית התנים ותוארה בעבודות רבות (3). בתקופת המנדט הבריטי, ועד 1964, היו התנים הטורפים הנפוצים ביותר ונשאי הכלבת העיקריים בין חיות הבר. בשנת 1964 אורגנה בישראל על-ידי משרד החקלאות הרעלה המונית של תנים בעיקר

וטורפים נוספים. הרעלה זו בוצעה כדי למנוע את הנזקים שהתנים גרמו כביכול לחקלאות (פגיעה בצנרת הפלסטיק של ההשקיה ובגידולים תחת יריעות פלסטיק). כתוצאה מהפחתה קיצונית של אוכלוסיות הטורפים הטבעיים, עד כדי הכחדת אוכלוסיות מסוימות, נצפתה עלייה רבה בנזקי מכרסמים בשטחים חקלאיים (3). תוצאות ההרעלה המחישה את חשיבותם האקולוגית של טורפים גם באזורים של חקלאות מפותחת (4). התאוששות אוכלוסיית התנים פיגרה אחרי זו של יתר הטורפים, במיוחד אוכלוסיית השועל המצוי *(Vulpes vulpes)* שלא דוכאה עוד על ידי מתחרה אקולוגי דומיננטי (4). לפני שנת 1964 היה התן הטורף היחיד שלא היה מוגן על ידי חוק הגנת הבר, אך לאחר שהובנו תוצאות ההרעלה הוכלל גם הוא ברשימת המינים המוגנים במסגרת החוק להגנת חיות בר (4).

בשנים האחרונות אנו עדים להתאוששות אוכלוסיות התנים והם מוגדרים כמין מתפרץ (5). סניטציה לקויה, ריבוי מקורות אשפה או חקלאות לולים בה מושלכים פסדים בקרבת מתקני הגידול מובילים להשפעה ישירה על אוכלוסיות טורפים כגון התן, הגורמת לזמינות מזון רבה עבורם (מעבר למצאי הטבעי) (6). רשות הטבע והגנים מנטרת את אוכלוסיית התנים בכל איזור פיקוח, מקיימת ספירות תנים במסלולים קבועים, בקרבת יישובים ובשטחים פתוחים ובהתאם לנתונים, פועלת משיקולי שמירת טבע (על בסיס סעיף 3 בחוק להגנת חיות הבר) לדללם באמצעות ירייה או לכידה (5). יעילותה של שיטת הדילול כאמצעי בר-קיימא לשליטה באוכלוסיות מינים מתפרצים מוטלת בספק (2). תגובת פיצוי רבה של אוכלוסיית הטורפים (הגירה והגברת ריבוי טבעי) גרמה לכך שתוכניות שליטה רבות, במינים פולשים או מתפרצים, שהתבססו רק על דילול, נחלו הצלחה לטווח קצר בלבד. במחקר שבחן נתונים דמוגרפים מתוכנית שליטה באוכלוסייתו המתפרצת של השועל המצוי בקליפורניה ארה"ב, נמצא כי בכדי להפחית ולייצב את האוכלוסיה, יש צורך ללכוד לפחות 50% מהפרטים הבוגרים ו-25% מהפרטים הצעירים. בקצב לכידה של בין 50% ל-70% מהאוכלוסיה, אוכלוסיית השועלים השתנתה וכללה בממוצע בין 20% ל- 52% מהגרים. במחקר נמצא שלכידה של שועלים בוגרים, המהווים את המטרה העיקרית בתוכנית השליטה, פחות אפקטיבית מפעולות להקטנת השרידות ורבייה של פרטים צעירים. לטווח הארוך, החוקרים המליצו לתוכניות שליטה להתמקד בגורמים המשפיעים על אוכלוסיות הצעירים והמהגרים (2). אסטרטגיית חלופית לשליטה באוכלוסיה, היא הגבלת משאבי קיום ממקור אנושי. בניסוי שבוצע במושב בגליל אובחן שינוי משמעותי בהגדלת תחומי מחייה של שועלים ותנים, לאחר הפעלת פרויקט ל"הפחתת

מזון זמין" לטורפים על ידי העברת פגרי עופות מלולי המושב למתקן איסוף פסולת. אובחנה ירידה בשרידה של השועלים והתנים במרבית היישובים, ובמקביל תועדה הגירה של מרבית התנים אל מחוץ לשטחי המושבים תוך חיפוש נחלות חדשות (6). במקביל החוקרים בחנו את השינוי בחברת היונקים הקטנים בקרבת היישובים ובאזור טבעי מרוחק. העבודה הראתה שלא נגרמו הבדלים בצפיפות האוכלוסיות ובשיעורי השרידה של המכרסם העיקרי בשטח המחקר- היערון הגדול (*Apodemus mystacinus)* בין האזורים המטופלים לאזורי הביקורת ולאזורים הטבעיים שמרוחקים מהמושבים. התוצאות מוסברת על ידי החוקרים כמבטאות מצב בו כתוצאה מזמינות מזון גבוהה במערכת החקלאית במשך עשרות שנים ,הטורפים אינם מתפקדים כגורם המווסת את אוכלוסיית היונקים הקטנים וגם לאחר צמצום המזון ממקור אדם הטורפים לא למדו מחדש שיחור בטבע בתקופת המחקר (6).

שכיחותם הגבוהה של התנים ברב חלקי הארץ (מלכיש ומישור החוף הדרומי, צפונה) ובעיקר בגולן, בגליל, בכרמל ובהרי יהודה, ברורה לכל מטייל או חקלאי באזור, אך מתוך תצפיות של פקחי רשות הטבע והגנים עולה העובדה כי שכיחותם עולה גם בדרום הארץ. כיום הם נצפים סביב יישובים בדרום, בפריסה מקוטעת עד אילת (מידע מרשות הטבע והגנים, שלא פורסם), אזורים שבעבר לא נראו בהם תנים (3,4).

תופעה זו של התפשטות התנים דרומה הינה תופעה חדשה יחסית והשלכותיה כמעט ולא נחקרו. בכדי שנבין את השלכותיה על הסביבה ובכדי לבחון את ההנחה כי התנים נסמכים על מקורות מזון אנטרופוגנים, יש צורך לחקור את תזונת התנים באותם אזורים.

1.2. <u>תזונת התן הזהוב</u>

התן הוא אומניבור הניזון מיונקים קטנים, ציפורים, זוחלים, פגרים, פרוקי רגליים, פירות, ירקות וכן משיירי מזון ואשפה. התן גם צד דגים במים רדודים, בטבלו את ראשו במים. הרכב המזון ותרומת כל אחד מאותם מרכיבי מזון לתזונת התן תלויה בתנאים הספציפיים לאותו אזור (1). אסטרטגיית האכילה גם היא מושפעת מהמשאבים המצויים באיזור, בעוד שאכילת נבלות ידועה כאופיינית לתזונתו של התן הזהוב, ידוע כי גם טריפה הינה אסטרטגיה תזונתית אפשרית, המושפעת מהמשאבים באיזור. במחקר שנערך ברמת הגולן הממוקמת בצפון מזרח ישראל, איזור בו יש שפע של עדרי בקר לבשר, נמצא כי בין

1.5%-1.9% מעגלי הבקר לבשר שנולדו במהלך תקופת המחקר מצאו את מותם בעקבות טריפה, בעיקר ע"י תנים (7). בגליל, עקב מיעוט בשטחי עיבוד, נפוצה חקלאות לולים ובפרט לולי מטילות. מתקני הגידול של העופות ממוקמים בתוך היישובים ובסמוך להם. כחלק מתהליך הגידול מצטברת כמות ניכרת של פגרי בעלי חיים ובהעדר מערכות ראויות להסדרת פסולת זו, מושלכים הפסדים בצדי דרכים ובמזבלות פתוחות. תופעה זו יוצרת תחנות האכלה "עשירות", ונחשבת גורם עיקרי לגידול הניכר של אוכלוסיות טורפים (שועלים ותנים) סביב ליישובים אלו (6).

במחקרים שנערכו ברחבי תפוצותו של התן הזהוב בעולם, עולה העובדה כי כיאה לאומניבור ואופורטוניסט, תזונתו של התן מגוונת ומשקפת את אפשרויות התזונה בסביבה הספציפית בה הוא נמצא. במחקר העוסק בחשיבות המכרסמים בתזונתם של חתול הביצות (*Felis chaus*), קרקל (*Caracal caracal*) ותן זהוב בשמורת טבע הנמצאת באזור חצי צחיח בראג'סטאן שבמערב הודו נמצא שמכרסמים היוו טרף חשוב יותר בתזונתם של החתולים מאשר בתזונתו של התן. עד כ70% מהאנרגיה המטבולית היומית של החתולים סופקה ממכרסמים בהשוואה ל45% בתנים. כמו כן נמצאו שיירי מזון צמחי בדגימות התנים באחוזים גבוהים הרבה יותר מאשר בחתוליים (8). במחקר אחר המשווה בין תזונת התן הזהוב לתזונת השועל המצוי בדרום-מערב הונגריה (אזור שבו התן הזהוב הופיע רק במהלך המאה שעברה) בתקופות החורף והאביב, נמצא שתזונת התן הזהוב בדומה לתזונת השועל המצוי בוססה בראש וראשונה מטריפה של יונקים קטנים (בעיקר מכרסמים) וכן מאכילת פגרי מכפילי פרסה (9). לעומתו מחקר שנערך בצפון מזרח יוון מצא שתזונת התנים בתקופת הנקת הצאצאים באזור מבוססת בעיקר על פגרי של חיות משק: מכפילי פרסה וכן אווזים וברווזים (10). אותו צוות חוקרים ביצע מחקר בדרום יוון, בו נמצא כי המסה הביולוגית העיקרית של תזונת התנים באיזורי המחקר התבססה על פגרי מכפילי פרסה ונמצאו שרידים מעטים יחסית של טרף ממקור של יונקים קטנים (11). את השכיחות הנמוכה הזו של מכרסמים בתזונת התן, ניתן לייחס לכך שבשל עודף המזון, התן אינו מבצע שיחור מזון טבעי ואיבד את תפקידו כטורף משמעותי של המכרסמים (6).

במחקר שהתפרסם לאחרונה, נחקרה תזונתו בפארק בריטניה אשר במרכז ישראל. בפארק בריטניה קיימת אוכ' תנים בצפיפות גבוהה ומטרת המחקר היתה לחקור את הגורמים האנטרופוגנים המאפשרים לתן הזהוב להגיע לצפיפות גבוהה שכזו. המחקר כלל אנליזה מורפולוגית של צואת תנים, נבחנה

השפעת העונה (קיץ וסתיו) וכן השפעת הפעילות האנטרופגנית, כשם שהיא מתבטאת בחלקים שונים של הפארק. בפארק מתקיימת פעילות של רעיית בקר וצאן (בעיקר כבשים), ובחלק הצפוני של הפארק ישנה מזבלה גדולה. במחקר נמצא שקטגוריית המזון העיקרית היתה מכפילי פרסה מבוייתים (החוקרים הניחו שרובם נאכלו כפגרים). לאחר מכן, על פי סדר כרונולוגי הופיעו בתזונת התן קטגוריות המזונות הבאים: פירות, ציפורים, יונקים קטנים, פרוקי רגליים. הקטגוריה האחרונה בסדר השכיחות היתה אשפה שנמצאה רק ב 9.1% מהדגימות. לא נמצאה השפעה כללית של העונה או הבדלים בתזונת התנים בין חלקי הפארק בהם קיימת השפעה אנטרופוגנית שונה על הסביבה, אך נמצאה שונות בתזונת התנים בין מחילות תנים שונות בקיץ ונמצאה פרופורציה גבוהה יותר של תזונה ממכרסמים בסתיו לעומת הקיץ. החוקרים הניחו שזמינות רבה של פגרי מכפילי פרסה מאפשרת את הצפיפות הגבוהה של התנים באיזורי הפארק (12).

1.3 <u>שיטות מורפולוגיות וגנטיות לזיהוי טקסונומי של טרף</u>

במרבית המחקרים העוסקים בהעדפת טרף על ידי טורפים בשדה, לא ניתן לבצע כימות וליצור תמונה של העדפת טרף רק על ידי מעקב ישיר אחר פעילות הטורפים (13). שרידי הטרף יכולים לעבור זיהוי מורפולוגי חזותי של המעכל במערכת העיכול או על ידי אנליזה של צואת הטורף. בכל אותם מחקרים שצויינו לעיל, העוסקים בחקר תזונת התן הזהוב, נעשתה אנליזה מורפולוגית של צואת התנים. הצואה סווגה כצואת תנים על סמך מאפיינים טיפוסיים לצואה ובהתאם לאיזורי מחייה אופייניים לתנים באיזורי המחקר (8-12). לאחר הפרדת שרידי המעכל בצואה, החוקרים ביצעו אנליזה לשרידים ע"פ מאפיינים מורפולוגים, נפח המעכל הוערך סובייקטיבית והופעלו עליו גורמי מתאם שונים בכדי להעריך את תרומת המרכיב המזוני (לדוגמא:יונקים קטנים) לתזונה הכללית של התנים באותו איזור (11).

לא כל הטורפים צורכים במזונם שיירים מוצקים המאפשרים אנליזה מורפולוגית של הטרף, גם באלו שכן, כדוגמת התן הזהוב, המעכל גם כולל שיירים רכים שלא מותירים שיירים הניתנים לאנליזה בצואה (13). אופן לעיסת העצמות הטיפוסית לטורפים (gnawing) עלולה לגרום בהם שינויים שיקשו משמעותית על מלאכת הזיהוי. במחקרים רבים שעסקו באנליזת שרידי עצמות מצואת כלביים נמצא שמרבית העצמות היו

שבורות לחתיכות רבות, באופן משמעותי יותר מעצמות שנמצאו בצנפות דורסים, הבועלים את מזונם. ברוב המקרים שברי העצמות אינם גדולים מקוטר של 1 ס"מ ורובם אינם ניתנים לזיהוי (14). התוצאה במקרים רבים עלולה להוביל לתמונה מוטה ומוגבלת של בחירת הטרף (13). זיהוי טקסונומי של מיני בעלי חיים שונים, נעשה מסורתית מזה מאות שנים ע"פ מאפיינים מורפולוגים. מגוון המינים הרב, השונות הגנוטיפית והפנוטיפית והעובדה כי קיימים מאפיינים מורפולוגים שונים בין פרטים באותו מין עקב תכונות כגון זוויג או שלב חיים, מקשה על מלאכת הזיהוי. שיטה זו מצריכה ידע ומומחיות רבים, ונפוצים בה טעויות הנובעות מהגמישות הפנוטיפית (15). לעומת הגישה המורפולוגית המנצלת את השונות הפטוניפית לטובת האנליזה, גישות גנומיות לאבחון טקסונומי נעזרות בשונות הגנטית ברצף הדנ"א לטובת זיהוי הפרט (15). מחקרים רבים המנסים לקבוע את מין בעל החיים או שרידיו, מסתמכים על גנים מיטוכונדריאלים. לגנום המיטוכונדריאלי שיעור מוטציה גבוה בהשוואה לדנ"א גנומי ועל כן ישנה שונות גדולה ברצף הגנום המיטוכנודריאלי בין מינים המאפשרת שימוש ברצף קצר יותר לזיהוי. הגנום המיטוכונדריאלי חסר אינטרונים וכמעט שאינו חשוף לרקומבינציות (15). בנוסף, לגנום המיטוכונדריאלי יש מספר עותקים רב בכל תא, עובדה המאפשרת את מיצוי הדנ"א בדוגמאות שרמת שימור הדנ"א בהן ירודה (15). בראשית שנות השמונים של המאה הקודמת פותחה תגובת ה– polymerase chain reaction (PCR) המאפשרת הגברת מקטעי דנ"א כך שניתן להשוות ולבחון שונות בין מעקובות דנ"א של גנים שונים (16). בכדי שיתאפשר זיהוי טקסונומי ממעקובת דנ"א ישנו צורך בסמן אוניברסלי לזיהוי מיני בע"ח (15). בעבודות פילוגניות רבות נעשה שימוש בגנים המיטוכונדריאלים המקודדים לריבוזומים 12S ו- 16S מכיוון שגנים אלו שמורים בין מינים שונים (17). למרות היתרונות בביצוע אפיון טקסונומי באמצעים גנטים מולקולרים, במחקרים רבים כשם שצויין לעיל עדיין נעשה שימוש רב באנליזה מורפולוגית עקב יתרונות הנובעים מעלויות נמוכות, היקף עבודה נמוך יותר, רגישות נמוכה יותר לרמת שימור הדגימות ואפקטיביות רבה במחקרים בהן יש מספר רב של דגימות. לכאורה נראה שעל ידי שילוב בין אנליזה מורפולוגית לאנליזה גנטית מולקולרית ניתן יהיה לשלב בין היתרונות של שתי הגישות ובכך להגיע לתמונה אמינה ומדוייקת יותר לתזונת התן.

1.4 השערות העבודה ומטרותיה

במסגרת מדיניות רשות הטבע והגנים לשמירה על מגוון המינים ונקיטת פעולות לבקרת הגודל של אוכלוסית מין מתפרץ, מתקיימת פעילות של דילול תנים באמצעות ירי. פעילות זו נעשית גם כמענה חלקי לבעיות הנוצרות בשל העצמת הקונפליקט שבין התנים לאדם. פעילות זו אפשרה לבצע מחקר המתמקד בזיהוי ואיפיון מורפולוגי וגנטי של תכולות הקיבה של תנים שדוללו בשטח המחקר. ביצוע האנליזה בתכולת הקיבות מאפשר זיהוי של שיירי מזון שלא ניתן לזהותם בצואה לאחר תהליכי העיכול. השערות העבודה הן שתכולות הקיבה ישקפו את תזונתו האומניבורית והאופורטוניסטית של התן בשטח המחקר. שטח המחקר כפי שיפורט בפרק החומרים והשיטות הינו גבול תפוצתם ההולכת ומדרימה, של התנים בארץ. מרבית התנים בשטח זה מצויים סביב יישובים, על כן סביר להניח שבחלק גדול מהדגימות יהיו סימנים להשפעה האנושית על הופעת התן באזור זה. כלומר מרבית הדגימות יכילו אשפה, חפצים אנטרופוגנים לא נעכלים, שרידי חיות משק, גידולים חקלאיים ובעלי חיים מלווי אדם. לפיכך מטרות העבודה:

1. זיהוי ואיפיון מורפולוגי וגנטי לתכולות הקיבה של תנים שדוללו בשטח המחקר. זיהוי שרידי יונקים וציפורים לרמת המין ותיאור איכותי של תכולת קיבה שמקורה צמחי, זוחלים, פרוקי רגליים, שיירי מזון ואשפה.
2. דיון מדעי בממשק התנים בשטח המחקר בהתבסס על איסוף הנתונים וקביעת תזונת אוכלוסיית התנים באיזור.

2. חומרים ושיטות

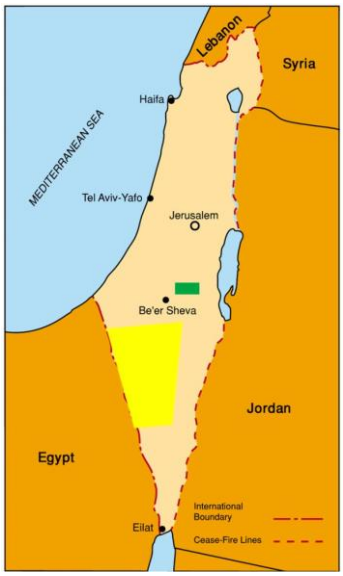
2.1 שטח המחקר:

המחקר בוצע בדרום ישראל והתמקד באזור מרכז וצפון הנגב. שטח המחקר במרכז הנגב חופף לשטחה של המועצה האזורית רמת הנגב (איור מספר 1). המועצה אזורית של רמת הנגב הינה המועצה הגדולה ביותר בישראל, שטחה משתרע על כארבעה מיליון דונם והיא תופסת כ-30% משטח הנגב ו-22% משטחה של מדינת ישראל. שטחים אלו מתפרשים מצומת הנגב בצפון עד למכתש רמון בדרום, מכביש 10 במערב (לאורך הגבול עם מצרים) עד למכתש הגדול במזרח. על פי הלשכה המרכזית לסטיסטיקה, מספר התושבים במועצה, נכון לתחילת שנת 2011, מונה 4900 תושבים, המרוכזים ב 11 יישובים (18). בתחום שטחה של מועצה אזורית רמת הנגב מצויות שתי מועצות מקומיות: מועצה מקומית ירוחם ומועצה מקומית מצפה רמון, שמספר תושביהן נכון לתחילת שנת 2011, מונה 8350 ו4800 תושבים בהתאמה (18). במועצה מתקיימות פעילויות של חקלאות אינטנסיבית ואקסטנסיבית (בעיקר על ידי המגזר הבדואי), תיירות וצבא. פעילויות אלו, עשויית בהחלט לספק פסולת מזון לאוכלוסיות התנים. בשטחי המועצה שוררים תנאים מדבריים, ההולכים וגוברים כלפי דרום. בשדה בוקר אשר ממוקמת במרכז רמת הנגב, כמות המשקעים השנתית הממוצעת הינה כ- 100 מ"מ, היורדים ב 25 ימי גשם בלבד. בחודשי הקיץ הטמפרטורה היומית הממוצעת היא 24.7 מ"צ וטמפרטורת המקסימום היומית הממוצעת היא כ- 32 מ"צ. בחודשי החורף הטמפרטורה הממוצעת היא 9-11 מ"צ, טמפרטורת המקסימום היומית היא בתחום 15-17 מ"צ וטמפרטורת המינימום היומי הוא בתחום 5.5-7.5 מ"צ. תנודת הטמפרטורה היומית היא מהגבוהות בארץ בכל עונות השנה (19). הצמחייה הטבעית באיזור היא צמחייה מדברית, המתפתחת בעיקר בוואדיות. עצי אשל היאור (*Tamarix nilotica*) שולטים באזורים בהם יש מי תהום קרובים לפני הקרקע. המדרונות מכוסים בבני שיח רב שנתיים, אשר שורדים במדבר לאורך שנים ומהווים אלמנט קבוע בנוף (4).

שטח המחקר הצפוני הינו איזור יער יתיר ופאתי הישוב מיתר (במערב השטח) הממוקמים בשיפוליו של דרום הר חברון שמצפון-מזרח לבאר שבע (איור מספר 1). יער יתיר הינו יער נטוע הגדול ביערות ישראל, שטחו של היער הוא כ- 30,000 דונם. הישובים הר עמשא ובית יתיר תוחמים אותו ממזרח

והיישוב ליבנה (שני) מצפון. בנוסף לעצים רחבי עלים, מרבית העצים ביער הם מחטניים נטועים (אורן ירושלמי וברוש מצוי). בסביבות היתר נמצאים מטעי עצי פרי נשירים. היער נמצא בספר המדבר אזור המעבר שבין החורשים והבתות המאפיינות את החבל הים-תיכוני ובין הצמחייה הערבתית והמדברית המאפיינת את הנגב ומדבר יהודה. בשל גובהו הנע בין 400- 850 מטרים מעל פני הים ותפניתו כלפי דרום-מערב, נהנה האזור ממידה יתירה של גשמים (בין 250- 275 מ"מ בממוצע רב שנתי) (19). פעילות אנושית כפרית באיזור יתיר מתרחשת בסביבותיו, באיזור הישובים התוחמים אותו, בעוד שמרכז שטח המחקר מהווה יער נטוע בו אין פעילות כזו. מצב זה שונה באיזור רמת הנגב, שהינו איזור גדול הרבה יותר ומקוטע במספר רב של איזורים מיושבים. בנוסף, פעילות סב-אורבנית וחקלאית מצד המגזר הבדואי, משמעותית ופזורה יותר באיזור רמת הנגב.

<u>איור מספר 1:</u> שטח המחקר. בצהוב מסומנת רמת הנגב, בירוק מסומן איזור יער יתיר.



2.2 <u>קביעת גודל מדגם:</u>

במהלך המחקר נבדק תוכן הקיבה של 47 תנים שנורו בשטח המחקר בין התאריכים 15.05.2008 – 21.02.2010. על סמך ההנחה שבפרפורציה של 0.6 מתכולות הקיבות שיבדקו ימצאו שרידים של מזון ואשפה ממקור אנטרופוגני, לפרופורציה זו, רווח סמך על פי מבחן פישר, ברמת בטחון של 95% מחושב כבין 0.44 ל 0.74. גודל מדגם זה מבוסס על הערכת גודל מדגם שתוכננה ל-50 פרטים בשלב תיכנון המחקר. מעבר לשיקולים הסטטיסטים, בהערכת גודל המדגם נלקחו בחשבון דיווחי פקחי רט"ג על מספר תצפיות התנים בשטח המחקר וקצב דילולם לפני המחקר. משיקולים אתים הקפדנו כי ביצוע המחקר לא ישפיע על קצב דילולם בשטח המחקר.

2.3 איסוף הדגימות:

בתקופת המחקר, במסגרת פעילותם השגרתית, דיללו פקחי רשות הטבע והגנים, 28 תנים מרחבי רמת הנגב ו- 19 תנים באיזור יער יתיר וסביבותיו. **למחקר לא היתה כל השפעה על מדיניות הדילול באזור המחקר.** לגבי כל תן שנכלל במחקר צויין תאריך הדילול, מיקום הלכידה (על סמך נקודה מדוייקת במפה או על בסיס נ"צ מ GPS), מין, הערכת גיל ועונה בשנה (קיץ: יוני-ספטמבר, סתיו: אוקטובר-נובמבר, חורף: דצמבר- מרץ, אביב: אפריל-מאי).

לאחר שנלקחו דגימות דם (לדם מלא ולסרום), גופות התנים הועברו מקוררות או קפואות ע"י מבצע העבודה ופקחי רשות הטבע והגנים למכון הפתולוגי בקרייה החקלאית בבית דגן. בהתאם לפרוטוקול ניטור החיסון האוראלי כנגד הכלבת, נלקחו ע"י צוות המכון מכל פרט: מוח, לסת תחתונה (Mandibula) מנדיבולה ועצם הירך (Femor) (לבדיקת כלבת ואכילת פתיונות חיסון כנגד כלבת), אוזן לבדיקה גנטית ופיסת סרעפת (לבדיקה פריזיטולוגית). במקביל נלקחה קיבת התנים שהוכנסה על תוכנה להקפאה במינוס 80 מעלות צלסיוס. המשך העבודה על דגימות קיבות התנים הותנה בשלילת נגיעות כלבת בדגימה.

2.4 ניקוי ומיון תכולות הקיבה:

ניקוי ומיון תכולות הקיבה התבצעו במעבדת האנטומיה של בית הספר הוטרינרי ע"ש קורט בפקולטה לחקלאות ברחובות. הקיבות הקפואות הועברו הפשרה איטית במקרר עד שהגיעו למצב המאפשר את פתיחתן והמשך העבודה. לאחר פתיחת הקיבות, בוצעה הערכה איכותית של התוכן בקיבה והוא חולק לחמש קטגוריות עיקריות: קיבה ללא תוכן, תוכן צמחי, תוכן המכיל אשפה וחפצים אנטרופוגנים לא עכילים, תוכן המכיל שרידי יונקים ותוכן המכיל שרידי עוף. תוכנה של כל קיבה צולם במצלמת סטילס. התוכן נשטף במים וסונן דרך שתי מסננות בעלות חורי סינון בגדלים משתנים. בוצעה הפרדה של שערות, נוצות, עצמות, חתיכות בשר, שיירי חומר צמחי וחומרים בלתי עכילים.

2.5 איפון מורפולוגי:

דגימות הכוללות עצמות, שערות, נוצות, מאפיינים אנטומיים יחודיים, גלעיני פירות וזרעים אופיינו מורפולוגית. איפיון זה נעשה בהדרכתם והנחייתם של מומחים העוסקים בתחומי מחקר הרלוונטים למלאכת האיפיון המורפולוגי.

לאחר הפרדה וניקוי של שרידי העצמות, הן נבחנו מורפולוגית בעזרתו של ד"ר יהושוע מילגרם ממחלקת כירורגיית חיות קטנות, בביה"ס לרפואה וטרינרית ובעזרתה של ד"ר רבקה רבינוביץ מהמכון למדעי כדה"א והמכון לארכיאולוגיה, האוניברסיטה העברית בירושלים. חלקיקים קטנים של עצמות נבחנו תחת סטריאומיקרוסקופ בינקולר בהגדלה 40X. איפיון התבצע לרמת המין, במידה ושרידי העצמות נשתמרו באופן שכולל מאפיינים מורפולוגים יחודיים למין (נספח 1.1). איפיון לרמת הסדרה התבצע בעזרת הערכת גודל העצמות ומיקומם האנטומי בגוף הטרף, במידה ושרידי העצמות לא הכילו מאפיינים יחודית למין. האיפיון המורפולוגי הסתמך בנוסף על שרידי נוצות, מאפיינים יחודיים כגון קוצים של דרבן מצוי *(Hystrix indica)* ואיברים שנותרו שלמים. איפיון מורפולוגי של שרידי בעלי כנף ע"פ מבנה נוצות שנמצאו בוצע בהנחייתו של אוהד הצופה, אקולוג עופות ברשות הטבע והגנים. האפיון נעשה על סמך ניסיונם האישי של המומחים, בהתבסס על הספרות (1, 3, 4, 20, 21) ועל בסיס אוספי הטבע הלאומיים של האוניברסיטה העברית הממוקמים בקמפוס ע"ש אדמונד י' ספרא בגבעת רם, הפקולטה למדעי הטבע.

האיפיון המורפולוגי לשרידי יונקים, הושלם על ידי ניתוח של מבנה השערות שנמצאו בתוכן הקיבה. השערות אופיינו מורפולוגית בעזרתו של ד"ר סיימון נמצוב, אקולוג חיות בר ברשות הטבע והגנים. האפיון בוצע במעבדה לזיהוי שערות של חיות בר ברשות הטבע והגנים. שרידי השערות נשטפו והושרו ב- Ethanol 96% למשך שבוע ולאחר מכן נבחנו וצולמו תחת מיקרוסקופ אור בהגדלה 100X (נספח 1.2). האפיון בוצע על סמך מבנה קשקשי הקוטיקולה, רוחב הקוטיקולה ודגם מדולת השערה בהתאם לטכניקה ומידע המתואר בספרות (22) ותוך שימוש במאגר המידע המצוי במעבדה לזיהוי שערות חיות בר שברשות הטבע והגנים.

זרעי וגלעיני הפירות אופיינו בעזרתו של פרופ' שחל אבו ראש החוג לגנטיקה והשבחה במכון למדעי הצומח בחקלאות, הפקלוטה לחקלאות באוניברסיטה העברית. הזיהוי בוצע בהתאם למבנה הגלעינים והזרעים, התבסס על ספרות (23) והושווה לגלעינים וזרעים שנאספו באיזור המחקר.

2.6 איפיון גנטי:

במהלך מיון תוכן הקיבה, הושמו רקמות המתאימות לאיפיון גנטי בצלוחיות פטרי נפרדות. לטובת האיפיון הגנטי נבחרו רקמות הכוללות עצמות, חתיכות בשר, עור מחובר לפרווה או נוצות מחוברות לעור. האנליזה הגנטית נערכה במעבדה לאבולוציה מולקולרית של דר' גילה כחילה בר-גל בבית הספר הוטרינרי ע"ש קורט, בפקולטה לחקלאות ברחובות. בהתאם לאפיון המורפולוגי ועקב האפשרות הסבירה כי בקיבת התן ימצאו שרידים של בע"ח שונים, כאשר אופי הרקמות בקיבה נראה הטרוגני, הופק דנ"א ממספר רקמות שהיו חלק מתכולת הקיבה (נספח 2.1).

הפקת הדנ"א (DNA extraction):

מכיוון שתוכן קיבה מכיל חומרים אנדוגנים כדוגמת חומצות מרה, חומצה הידרוכלורית או חומרים אקסוגנים כדוגמת מעכל צמחי המכיל טנינים (Tannin) המפריעים לתהליך הפקת הדנ"א, דנ"א הופק בשתי שיטות מולקולריות לטובת קבלה מקסימלית של תוצאות. נעשה שימוש בשיטות ההפקה: Guanidium Thiocyanate Extraction (24) ובשיטת Phenol – Chloroform extraction (25,26).

Guanidinium thiocyanate Extraction (GuSCN):

שיטה זו משמשת ב20 השנים האחרונות, להפקת דנ"א מרקמות. ההפקה בוצעה לפי פרוטוקול המצוי בספרות (24). בוצע חיתוך הרקמות בעזרת סקלפל סטרילי, לחתיכות קטנות בגודל ממוצע של $2mm^2$. הרקמות הועברו למבחנת 1.5ml ולהן הוסף 500ul תמיסת גוואנדין המורכבת מ- 4M (GuSCN), pH 6.4 ,Tris-HCl 0.1M 6.4 ,EDTA 0.02M pH 6.4 ו- 1.3% Triton X-100. המבחנות הודגרו ב- 56 ^oC בטלטול למשך יממה במטרה לפוצץ את התאים ולשחרר את הדנ"א למדיום הנוזלי. לאחר יממה המבחנות הורתחו ב- 94 ^oC למשך 10 דקות, סורכוזו במהירות של 12000rpm למשך 5 דקות והנוזל העליון הועבר למבחנות סטריליות חדשות. למבחנות החדשות הוסף 1ml תמיסת Sodium Iodide

linear acrylamide 15ul-ו Silica beads (Sigma) 15ul ,(Sigma). בוצע ערבוב עדין של הדוגמאות והכנסתן לקרח למשך שעה כאשר כל רבע שעה מבצעים ערבוב עדין שלהן. מטרת שלב זה הינה לקבע את ה-DNA אל גרגירי הסיליקה. לאחר שלב הקיבוע בוצע סירכוז של הדוגמאות ב-5000rpm למשך 30 שניות, ליצירת פלט סיליקה. הנוזל העליון הוצא מהדגימות, משקע הסילקה נשטף ב- 500ul working wash buffer ולבסוף סורכזו הדגימות שוב ב – 5000rpm למשך חצי דקה. פרקציית הנוזל העליון נשפכה ונעשתה שטיפה שנייה ב 100% ethanol 200ul בכדי לשטוף את גרגרי הסיליקה. לאחר מכן סורכזו הדגימות שוב, האתנול הוצא והמבחנות הונחו לייבוש בטמפרטורת החדר למשך שעתיים לאפשר נידוף של כל האתנול בכדי שלא יהווה מעכב בריאקציית ה- PCR. בסוף כל תהליך הפקה הוספו PCR-ddH2O 100ul לשחרור הדנ"א מגרגירי הסיליקה אל המים. הדגימות הונחו ב- 56 ^{o}C למשך שעה בכדי לשחרר את הדנ"א מגרגירי הסיליקה. הדגימות נשמרו בטמפ' של 4 ^{o}C עד לשימוש. בכל תהליך הפקה הוספה מבחנה חסרת דנ"א עם תמיסת הגואנדין שהיוותה ביקורת שלילית למהלך ההפקה.

<u>Isoamyl alcohol- Phenol – Chloroform extraction:</u>

שיטה זו להפקת דנ"א הינה שיטה מוקדמת משיטת הגאונדין, זו שיטה יחסית מסורבלת, כוללת שימוש בממסים אורגניים רבים ומחייבת עבודה במנדף. מטעמים אלו לצורך הפקת דנ"א מרקמות רכות כיום, לרוב נעשית בשיטת הגואנדין. למרות הנוחות והבטיחות ביישום הפקה הגוואנדין, עדיין לא נמצא תחליף לשיטת הפנול כלורופורם ונעשה בה שימוש נרחב. אחד השימושים הנפוצים הוא הפקת דנ"א מדם ע"י סילוק ההמוגלובין והפקת הדנ"א מתאי דם לבנים (27). מכיוון ששיטה זו מאפשרת ניקיון רב של הדנ"א ממעכבים עקב השימוש בממסים רבים, שיטה זו נבחרה בעבודה לטובת הפקת הדנ"א מרקמות בתכולת הקיבה של התנים במקביל לשיטת הגוואנדין, בהתאם לפרוטוקול המופיע בספרות (25,26). לאחר חיתוך הרקמות בעזרת סקלפל סטרילי,לחתיכות קטנות בגודל ממוצע של 2mm^{2}, הוכנסו הרקמות החתוכות למבחנות 15ml ולהן הוסף 150ul SDS 10%, 2.85ml DNA Lysis Buffer 95% (המורכב מ 7.5 pH TRIS 50mM, NaCl 0.1M, EDTA 0.001M) ו 60ul Protein Kinase במטרה לשחרר את הדנ"א. המבחנות הודגרו ב-56^{o}C למשך יומיים. למבחנות הוסף Phenol (pH=7.5) ביחס 1:1

לכמות הנוזל במבחנה. המבחנות הונחו במטלטלת למשך 20 דקות ולאחר מכן עברו סרכוז ב 2000rpm במשך 5 דקות. הסרכוז הפריד את הנוזל שתי פאזות: פאזה עליונה שכוללת את הדנ"א ופאזה תחתונה שכוללת את שאר החומרים. בוצעה הפרדה של הפאזה העליונה מהפאזה התחתונה ע"י העברתה למבחנה חדשה ואליה הוסף Chloroform במיהול של 1:24 עם 2% isoamyl alcohol. המבחנות הונחו במטלטלת למשך 20 דקות וסרכוזו ב 2000rpm במשך 5 דקות. הפאזה העליונה הועברה שוב למבחנות חדשות. ונעשתה השקעה של הדנ"א ע"י הוספת 10% מסך נפח הנוזל של KCl בנוסף ל 100% Ethanol קר בנפח הכפול פי 2.5 מנפח הנוזל. לאחר מכן בוצע סירכוז בקור $4\ ^oC$ במהירות 2500rpm ל- 10 דקות. לאחר הסירכוז, הוצא הנוזל העליון מהמבחנות תוך שנשאר בתחתית משקע הדנ"א שנשטף שוב 1ml 70% Ethanol והועבר למבחנות בנפח 1.5ml. מבחנות אלו סורכזו במהירות של 14000rpm למשך 5 דקות. בסוף הסרכוז הוצא הנוזל ויובש משקע הדנ"א שנותר במבחנות. אל המשקע הוסף 100ul PCR-ddH_2O והמבחנות חוממו ב $56\ ^oC$ למשך שעה. בכל תהליך הפקה הוספה מבחנה חסרת DNA שהיוותה ביקורת שלילית למהלך ההפקה. הדגימות נשמרו בטמפ' של $4\ ^oC$ עד לשימוש.

<u>הגברה וריצוף הדנ"א:</u>

הגברת הדנ"א שהופק, נעשתה באמצעות ה-Polymerase Chain Reaction (PCR) בתוכנית ה-touchdown על פי פרוטוקול שפורסם בעבר בספרות (16). בכדי להגביר את מקטעי הגנים המיטוכונדריאלים, נעשה שימוש בתחלים שפורסמו בעבר כמגבירים את המקטעים 12s ו-16s (Primer 3; Primer 9;Primer 12sAves) (27). ריאקציית ה- PCR בוצעה עם תערובת שהורכבה מ-2.5ul בופר PCR, 2.5ul של dNTP's, 3.5ul של MgCl2 (25mM), 1ul מהתחלים, 0.25ul של AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Inc), 7ul דנ"א. הוספו מים מדוללים פעמיים (ddH2O) בכדי להשלים לנפח תמיסה סופי של 25ul. לביקורת חיובית נלקחו דוגמאות שידוע כי הוגברו בהצלחה בעבר ולביקורת שלילית הוספו מבחנות (ddH2O) ללא דנ"א. הפרדת הדנ"א הדו-גדילי בריאקציית ה-PCR התרחשה בטמפרטורה של $94\ ^oC$, טמפרטורת ה – annealing (היקשרות הפריימרים אל הדנ"א) נעה בין $48\ ^oC$ ל- $60\ ^oC$, כאשר טווח הטמפרטורות הספציפי ירד ב- $2\ ^oC$ בכל מחזור, ושלב

הארכת גדילי הדנ"א התקיים בטמפרטורה של $72\ ^{o}C$. בדיקת ההגברה של תוצרי ה – PCR נעשתה ע"י הרצת ג'ל אגרוז 1.5% לצד סולם המכיל דנ"א בגדלים הנעים מ- 100bp עד 10kbp, ב 400mA ו- 96V למשך 45 דקות, במטרה לקבוע הגברה חיובית. לצורך השוואת גדלי המקטעים המוגברים לקטעי הדנ"א בסולם נצבעו תוצרי הריאקציה ב- SYBER Green (XX) ועל ידי השוואת גודל התוצרים נקבע אם הוגברו המקטעים הרצויים.

בכל המקרים בהם ראקציית ה– PCR הצליחה, תוצרי ה – PCR הועברו נקיון על ידי DNA purification kit (Bioneer) או על-ידי תערובת EXO-SAP (USB). לאחר נקיון הדנ"א, רוצפו מקטעי הדנ"א המיטוכנדריאלים על ידי המרכז לטכנולוגיות גנומיות במחלקה למדעי החיים של האוניברסיטה העברית.

בכל המקרים בהם ריאקציית הPCR לא צלחה, נעשתה חזרה שנייה של ריאקציית PCR. הראקציה בוצעה לאחר תהליך של ניקיון ההפקות ע"י דילולן ב ddH2O, שיטת Microcon ® (Millipore) (נספח 2.2) ושיטת polyethylene glycol and ethanol (נספח 2.3). שיטת ה- polyethylene glycol בוצעה בדגימות שנמצא בהן תוכן צמחי רב, היות והשיטה ידועה ביעילותה בניקוי דגימות הכוללות מעכבים צמחיים כגון טנינים (28). במידה וראקציית ה PCR הצליחה, מקטעי הדנ"א נשלחו לריצוף.

כאשר הרצף שהתקבל נמצא זהה/דומה לרצף של בע"ח ממשפחת הכלביים (תן, זאב, כלב בית), בוצעה חזרה שנייה של ריאקציית PCR עקב חשש שמדובר בהגברה של דנ"א אנדוגני של הטורף ולא של הנטרף.

<u>בדיקת מעקובות הדנ"א:</u>

מעקובות הדנ"א נבחנו באמצעות תוכנת Sequencher (גרסה 4.9) (Gene Codes® Corp.) לשם בדיקת אמיתות קביעת הבסיסים. כל כרומטוגרפיה נבחנה בעין ועבור כל פרט הוכנה מעקובת דנ"א מייצגת (consensus) מתוך מעקובות גדילי ה – sense וה- anti-sense. לאחר מכן הושוו מעקובות הדנ"א למאגר המידע העולמי GenBank ע"י תוכנת BLAST – Local Alignment Search Tool באתר האינטרנט <u>www.blast.ncbi.nlm.nih.gov</u>.

2.7 ניתוח סטטיסטי

עבור כל אחד מסוגי המזון שנמצא בתכולות הקיבה (מתיאור קטגוריאלי ומרמת סוג כללי ועד רמת מין באפיון צומח ובע"ח), חושבו שכיחות ורווח סמך ברמת בטחון של 95%. עבור משתני רקע (גיל, מין, עונה ואיזור הדילול– [יער יתיר מול רמת הנגב]), בעלי השפעה על תזונת התנים באיזור המחקר, חושב מבחן Fisher's Exact test לאחר הכנסת הנתונים לטבלאות 2X2. עבור זיהוי בעלי חוליות, הוערכה התאמה בין שיטת הזיהוי המורפולוגית לבין שיטת הזיהוי הגנטית. לאחר הכנסת הנתונים לטבלאות 2X2, חושב מקדם ההסכמה למשתנים איכותיים- Cohen's Kappa, עבור זיהוי של כל בעל חוליות בשתי שיטות הזיהוי.

החישובים הסטיסטטים נערכו בתוכנת Winpepei (גרסה 11.4) (© J.H Abramson).

3. תוצאות

איסוף, איפיון וסיווג של הרכב תכולות הקיבה:

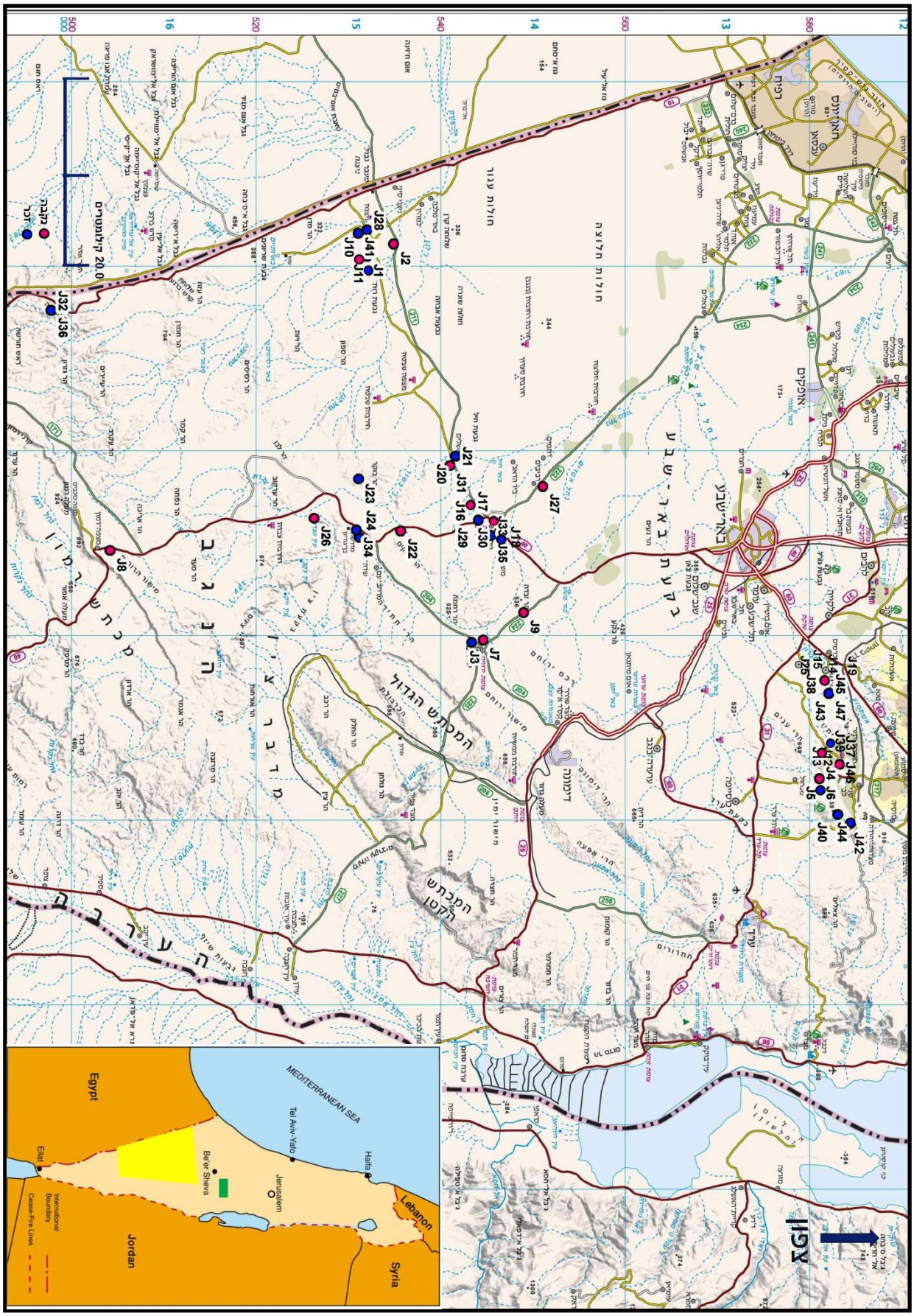
במהלך התקופה שבין מאי 2008 לבין פברואר 2010, דוללו על ידי פקחי רשות הטבע והגנים 47 תנים בשטח המחקר וקיבותיהם נאספו על ידינו. התנים דוללו באופן אקראי ונמצא ש-25 פרטים היו זכרים ו-22 היו נקבות. 40 מהפרטים הוערכו כבוגרים ו- 7 הוערכו כצעירים. 8 דוללו בקיץ (בין החודשים יוני-ספטמבר), 16 דוללו בסתיו (בין החודשים אוקטובר-נובמבר), 17 דוללו בחורף (בין החודשים דצמבר-מרץ) ו- 6 דוללו באביב (בין החודשים אפריל-מאי). 28 תנים דוללו ברחבי רמת הנגב ו- 19 תנים באיזור יער יתיר וסביבותיו (איור מספר 2 ו- 3, טבלה מספר 1).

ב- 12 קיבות מתוך ה-47 קיבות שנלקחו מהתנים, לא נמצא כלל מעכל (שכיחות של 25.5%). ב- 14 קיבות מתוך 35 הקיבות הנותרות, נמצא תוכן שמקורו באכילת אשפה (40%). בקיבות אלו באופן טיפוסי נמצא מזון אנושי (למשל תוכן בצקי, כנראה עקב אכילת לחם) ושרידים של אריזות מזון ושקיות ניילון. ב- 24 קיבות נמצאו שרידי יונקים כאשר 12 מתוכם אופיינו מורפולוגית וגנטית כיונקים מבוייתים (שכיחות של 34.3%) ובשאר 12 הקיבות אופיינו שרידי יונקי בר (34.3%). ב-15 קיבות נמצא תוכן צמחי, כאשר מתוכן ב- 10 קיבות נמצאו שרידי פירות (28.6%) וב-5 קיבות שרידי זרעים, גבעולים ועשב (14.3%). ב-13 קיבות נמצאו שרידים של בעלי כנף: 8 מתוכם אופיינו כעופות משק (22.9%) ו-5 כציפורים (14.3%). כמו כן נמצאו בשתיים מהקיבות שרידים של פרוקי רגליים (5.7%), בקיבה אחת שרידי דגים (2.9%) ובקיבה אחרת שרידים של זוחל (2.9%) (טבלה מספר 1). ב-5 מהקיבות נמצאו שברי קליפות ביצים. בקיבות אלו נמצאו גם שרידים אחרים של בעלי כנף, כך שסביר שמדובר בביצי עופות ולא בביצי זוחלים. פריטי מזון המושפעים מפעילות אנטרופוגנית ישירה כוללים את האשפה, חיות מבוייתות, חיות משק וגידולים חקלאיים. פריטי מזון כאלו נמצאו ב-27 קיבות מתוך 35 (שכיחות של 77.1%). שכיחות ורווח סמך ברמת בטחון של 95% (C.I) חושבה למספר הקיבות בהן נמצאו פריטי מזון מסוגים שונים (איור מספר 3). לאחר סכימת סך כל פריטי המזון שנמצאו בשיטות הזיהוי השונות, חושבו השכיחות ורווח סמך ברמת בטחון של 95% לכל אחד מפריטי המזון. (איור מספר 4).

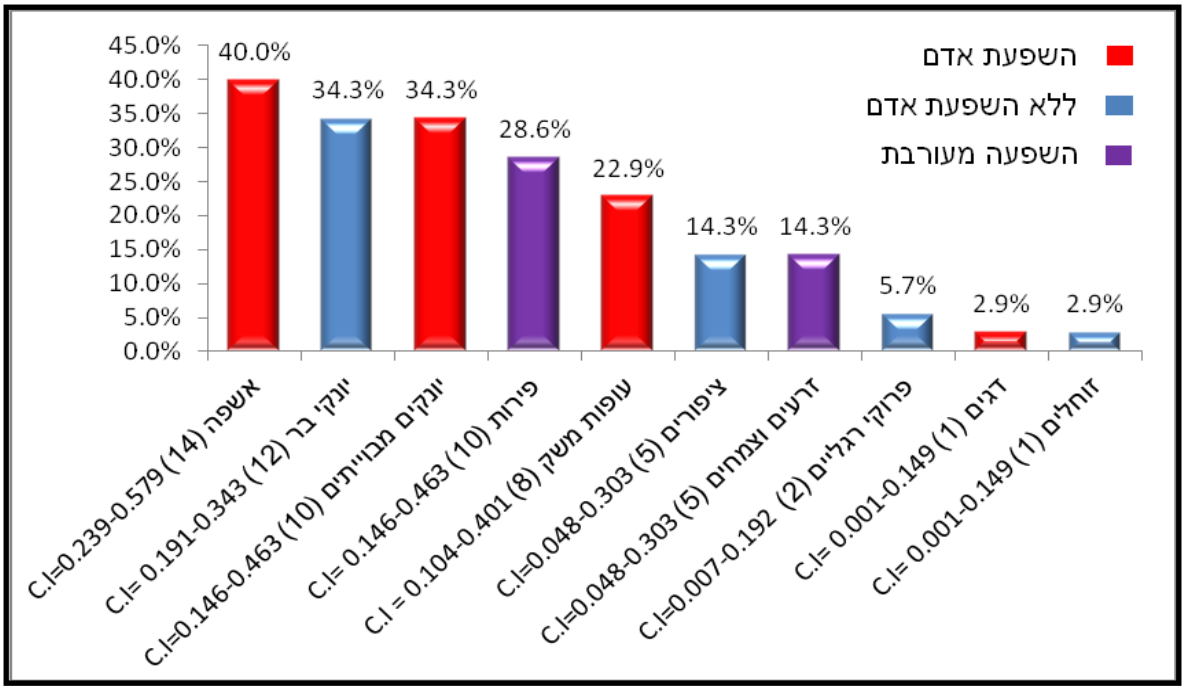
<u>טבלה מספר 1:</u> פרטי התנים במחקר והרכב קטגוריאלי של תכולות הקיבה שלהם

פרט (47)	תאריך דילול	זוויג	הערכת גיל	אתר	נ.צ אורך / רוחב	עונה	תכולת הקיבה:					
							ריקה (12)	עוף (13)	אשפה (14)	צומח (15)	יונק (24)	שונות (4)
J1	28/08/2008	ז	בוגר	קציעות	148939/532029	קיץ			V			
J2	28/08/2008	נ	צעיר	צומת קציעות	147555/534937	קיץ			V	V		
J3	04/08/2009	ז	בוגר	חוות נעמה	190781/543381	קיץ		V	V		V	
J4	08/02/2009	נ	בוגר	יער יתיר	205511/581037	חורף				V		
J5	08/02/2009	ז	בוגר	יער יתיר	205511/581037	חורף				V	V	
J6	08/02/2009	ז	בוגר	יער יתיר	205511/581037	חורף	V					
J7	20/02/2009	נ	בוגר	פארק ירוחם	190473/544590	חורף			V	V		V (*חרק*)
J8	15/05/2008	נ	בוגר	מצפה רמון	180791/504190	אביב	V					
J9	15/05/2008	נ	בוגר	הר צבוע	187491/548987	אביב		V		V	V	
J10	15/05/2008	נ	בוגר	קציעות	148939/532030	אביב			V	V		
J11	15/05/2008	ז	צעיר	קציעות	148939/532030	אביב			V	V	V	
J12	03/11/2009	נ	צעיר	יער יתיר	201318/584482	סתיו		V			V	
J13	03/11/2009	נ	צעיר	יער יתיר	201318/584482	סתיו	V					
J14	05/11/2009	נ	בוגר	חוות שי דרומי	196266/582081	סתיו			V		V	
J15	16/11/2009	נ	בוגר	חוות שי דרומי	196266/582081	סתיו			V	V	V	
J16	23/07/2009	נ	בוגר	ביסנ"מ	177507/544079	קיץ	V					
J17	01/11/2009	נ	בוגר	ביסנ"מ	177507/544079	סתיו		V			V	
J18	01/11/2009	ז	בוגר	צומת משאבים	178656/546457	סתיו				V	V	V (חרק)
J19	18/11/2009	ז	בוגר	חוות שי דרומי	196266/582081	סתיו		V			V	
J20	23/07/2009	ז	בוגר	אשלים	170606/541653	קיץ		V			V	
J21	17/06/2009	ז	בוגר	אשלים	170606/541653	קיץ				V	V	
J22	07/05/2009	נ	בוגר	חוות נחל בוקר	178671/535709	אביב		V				
J23	13/06/2009	ז	בוגר	קיבוץ רביבים	173054/531108	קיץ				V		V (דג)
J24	16/09/2009	ז	בוגר	שדה בוקר	179396/531191	קיץ	V					
J25	05/11/2009	נ	בוגר	חוות שי דרומי	196266/582081	סתיו					V	
J26	08/11/2009	נ	בוגר	עין עבדת	177300/526296	סתיו		V	V		V	
J27	13/05/2009	נ	בוגר	רביבים	173844/551089	אביב					V	
J28	24/02/2009	ז	בוגר	ניצנה	146064/532037	חורף		V			V	
J29	01/11/2009	ז	בוגר	ביסנ"מ	177507/544079	סתיו	V					
J30	01/11/2009	ז	בוגר	ביסנ"מ	177507/544079	סתיו	V					
J31	05/01/2010	נ	צעיר	צומת אשלים	171616/541017	חורף		V	V		V	
J32	19/02/2010	ז	צעיר	הר חורשה	156674/492573	חורף			V			
J33	11/03/2010	נ	בוגר	משאבי שדה	179141/545462	חורף	V					
J34	10/01/2010	ז	בוגר	צומת חלוקים	178531/530882	חורף			V		V	
J35	21/02/2010	ז	בוגר	משאבי שדה	179141/545462	חורף	V					
J36	19/02/2010	ז	בוגר	הר חורשה	156674/492573	חורף		V			V	
J37	30/01/2010	נ	בוגר	יער יתיר	200368/584432	חורף	V					
J38	19/11/2009	נ	בוגר	חוות שי דרומי	196266/582081	סתיו					V	
J39	30/01/2010	ז	בוגר	יער יתיר	200318/584482	חורף	V					
J40	19/11/2009	ז	בוגר	יער יתיר (הר עמשא)	209401/583052	סתיו		V			V	
J41	10/03/2010	ז	בוגר	תל ניצנה	146406/531056	חורף			V	V		
J42	18/02/2010	ז	צעיר	גד"ש הר חברון	212643/576286	חורף			V			
J43	19/11/2009	נ	בוגר	חוות שי דרומי	196266/582081	סתיו		V		V	V	
J44	31/01/2009	ז	בוגר	יער יתיר (הר עמשא)	209401/583052	חורף				V		
J45	19/11/2009	ז	בוגר	חוות שי דרומי	196266/582081	סתיו	V					
J46	31/01/2009	נ	בוגר	יער יתיר	200348/584455	חורף				V	V	
J47	13/11/2009	ז	בוגר	חוות שי דרומי	196266/582081	סתיו					V	V (זוחל)

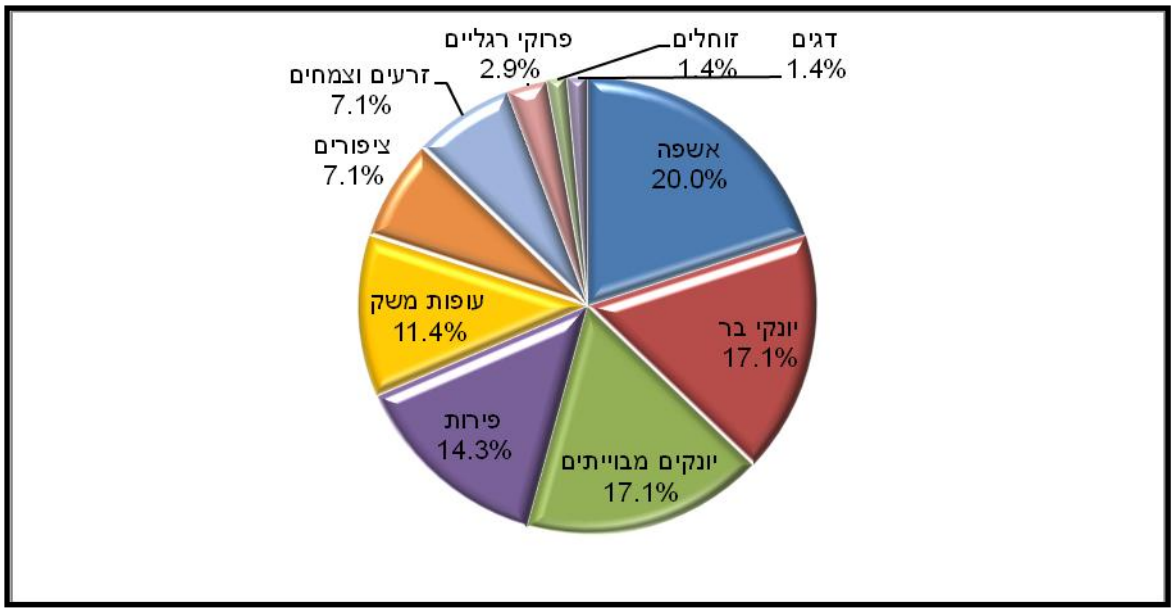
<u>איור מספר 2:</u> פיזור גיאוגרפי של התנים שהוכנסו למחקר באיזור רמת הנגב



<u>איור מספר 3:</u> שכיחות ורווח סמך ברמת בטחון של 95% (C.I) להמצאות פריטי מזון שונים בקיבות וחלוקתם לפריטי מזון שמקורם בהשפעה אנושית ישירה (אדום), כאלו שלא נמצאה בהם השפעה שכזו (תכלת) וכאלו שבהם ההשפעה מעורבת (סגול).



<u>איור מספר 4:</u> שכיחות ורווח סמך ברמת בטחון של 95% (C.I) לשכיחות הופעת פריטי מזון בקיבות התנים.



בחינת השפעת גורמי רקע על הרכב תכולות הקיבה:

לשם בחינת השפעת גורמי הרקע העשויים להשפיע על תזונת התנים בשטח המחקר (גיל, מין, עונה, איזור הדילול–[איזור יער יתיר מול רמת הנגב]), הוכנסו הנתונים לטבלות קשר 2X2 וחושב מבחן Fisher's Exact test ברמת בטחון של 95%. (טבלה מספר 2 ו-3). הקשר היחיד שנמצא מובהק הינו הקשר שבין תזונה מאשפה לבין גיל התן (טבלה מספר 2). במרבית הקשרים נמצאה רמת מובהקות נמוכה, המעידה על חוסר קשר בין גורמי הרקע לתזונת התנים. יתכן ורמת מובהקות נמוכה זו אכן מייצגת את אוכלוסיית התנים הקיימת בשטח ונובעת מחוסר השפעה של גורמי הרקע שנבחנו על תזונת התנים. סיבות נוספות, עשויות לנבוע מגודל מדגם קטן ושטח מחקר גדול. כאמור, הקשר היחיד שנמצא מובהק, הינו הקשר שבין תזונה מאשפה לבין גיל התן. באופן מובהק סטטיסטית *(P=0.028)*, נמצא כי פרטים צעירים ניזונים מאשפה יותר מאשר הבוגרים (טבלה מספר 2). מכך ניתן לשער כי אשפה מהווה משאב חשוב וזמין לפרטים צעירים שעדיין לא הגיעו למומחיות בכישורי הציד וכישורים אחרים להשגת מזון. אכילת פסולת עשוייה להוות פתרון פשוט בהשגת מזון לתנים צעירים העוזבים את נחלת הוריהם בחיפוש אחר נחלה חדשה. כאמור קשר זה נמצא מובהק סטטיסטית, אולם יש לקחת בחשבון את גודל המדגם הקטן של קבוצת הצעירים (7 תנים מתוך 47 תנים במחקר).קשר נוסף שנמצא קרוב למובהקות סטטיסטית הוא הקשר בין תזונה מאשפה לאיזור הדילול *(P=0.089)*. נמצא שפרטים ברמת הנגב ניזונים בשכיחות רבה יותר מאשפה לעומת פרטים באיזור יער יתיר. יתכן שקשר זה נובע מההבדל בהיקף ופריסת הפעילות הסב-אורבנית בין יער יתיר לרמת הנגב (כפי שצויין בפרק החומרים והשיטות), כאמור קשר זה אינו מובהק ברמת בטחון של 95% .

קשר	מבחן Fisher's Exact test	קשר	מבחן Fisher's Exact test
קיבה ריקה – זוויג	P=0.747	קיבה ריקה – עונה	P=0.839
אשפה – זוויג	P=1.000	אשפה – עונה	P=0.296
צמחי- זוויג	P=1.000	צמחי- עונה	P= 0.113
עופות- זוויג	P=1.000	עופות- עונה	P= 0.460
יונקים – זוויג	P=0.164	יונקים – עונה	P=0.166
קיבה ריקה – גיל	P=0.659	קיבה ריקה – איזור הדילול	P=1.000
אשפה – גיל	P=0.028*	אשפה – איזור הדילול	P=0.089
צמחי- גיל	P=1.000	צמחי- איזור הדילול	P=1.000
עופות- גיל	P=0.640	עופות- איזור הדילול	P=0.488
יונקים – גיל	P=0.166	יונקים – איזור הדילול	P=0.488

<u>טבלה מספר 2:</u> ריכוז תוצאות מבחני Fisher's Exact test ברמת בטחון של 95%, לטובת בחינת קשרים בין גורמי רקע לבין הרכב תזונת התנים בשטח המחקר.

*תוצאה מובהקת סטטיסטית ברמת ביטחון של 95%.

<u>טבלה מספר 3:</u> דוגמא לביצוע טבלת קשר 2X2 לבחינת קשר בין הרכב תזונת התנים בשטח המחקר לבין גורמי רקע.טבלאות כאלו הוכנו עבור כל קשר שמופיע בטבלה מספר 2 ומתוכן חושבו מבחני Fisher's Exact test.

אשפה בקיבות- גיל			
סה"כ	אין אשפה	יש אשפה	
6	1	5	צעיר
29	20	9	בוגר
35	21	14	סה"כ
P=0.028			

<u>זיהוי טקסונומי מורפולוגי:</u>

הגדרה טקסונומיות לפריטי מזון מן החי והצומח שנמצאו ב 29 קיבות התנים, בוצעה תוך שימוש בשיטות הזיהוי המורפולוגיות שתוארו בפרק החומרים והשיטות (טבלה מספר 4). מתוך 47 קיבות התנים הוזנחו 18 קיבות שבהם לא היו ממצאים ברי בדיקה מורפולוגית (12 קיבות ריקות, 4 קיבות שבהן נמצאה תכולה של אשפה בלבד ו-2 קיבות בהן התוכן הצמחי כלל רק גבעולים ועשב שלא ניתן לאפיינם מורפולוגית).

האיפיון הטקסונומי של שרידי צומח בוצע באופן מורפולוגי בלבד, על פי מבנה גלעיני פירות וזרעים. למעט שרידי פרי השיזף המצוי (*Ziziphus spina-christi*) שנמצא ב-2 קיבות, כל שאר הפירות והזרעים אופיינו כשייכים לגידולים חקלאיים (בעיקר ענבים) או לצמחי תרבות או שלא זוהו (טבלה מס' 4).

ב-8 מתכולות הקיבה שנבחנו נמצאו שרידי דרבן מצוי והוא נמצא כמין בעל החיים השכיח ביותר בתכולות הקיבה (טבלה מס' 4). ב-5 מאותם זיהויים נמצאו קוצי דרבן רכים (הרחבה על ממצא זה, בפרק הדיון). הקשר בין תזונה מדרבנים לגורמי הרקע נבחנה בטבלת 2X2 ולא נמצאו קשרים מובהקים סטטיסטית. מכיוון שפריטי מזון אחרים היו בשכיחות נמוכה יותר, לא היה טעם לבחון סטטיסטית את הקשרים בין פריטי המזון לבין גורמי הרקע. חלק גדול מהעצמות שנמצאו היו שבורות לחתיכות קטנות

מהם היה קשה לאבחן ברמת סבירות גבוהה את מין בע"ח. עקב מצבן הירוד של רוב הנוצות שנמצאו בתכולות הקיבות ניתן היה לאפיין עופות בהתאם לנוצות רק לרמת הסדרה בלבד (לדוגמא סדרת ציפורי שיר) על סמך מבנה וגודל הנוצה. סך הכל בשיטות הזיהוי המורפולוגיות זוהו 60 פריטי מזון, 41 מתוכם לרמת המין ו-19 לרמת הסדרה (Order) או המחלקה (Class) (טבלה 4).

<u>טבלה מס' 4:</u> מספר ושכיחות פריטי מזון שזוהו באמצעות השיטות המורפולוגיות

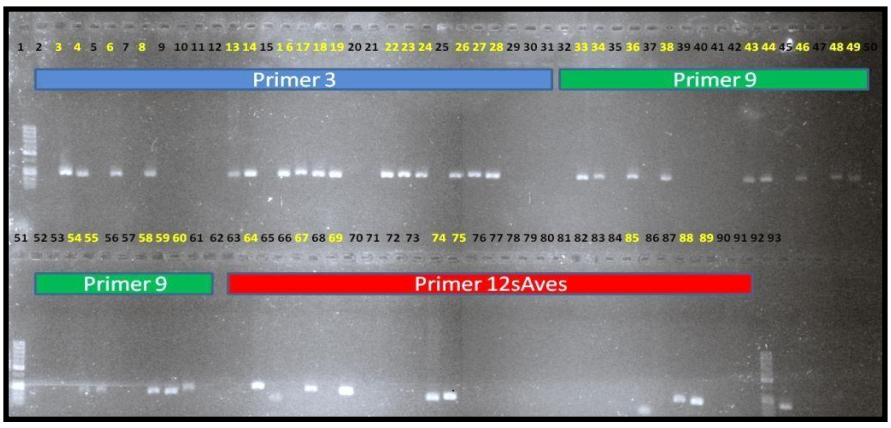
פריט מזון	מספר זיהויים	שכיחות	פריט מזון	מספר זיהויים	שכיחות
יונקים			**זוחלים**		
Hystrix indica (דרבן מצוי)	8	13.3%	*Testudo graeca*(צב יבשה מצוי)	1	1.6%
Ovis aries (כבש הבית)	3	5.0%	**דגים**		
Felis catus (חתול הבית)	2	3.3%	דג לא מזוהה	1	1.6%
Vulpes vulpes(שועל מצוי)	2	3.3%	**פרוקי רגלים**		
Bos Taurus (בקר הבית)	2	3.3%	*Orthoptera* (חגבאים)	1	1.6%
Lepus capensis (ארנבת מצויה)	2	3.3%	*Coleoptera* (חיפושיות)	1	1.6%
Canis lupus familiaris (כלב הבית)	2	3.3%	**פירות וזרעים**		
Capra hircus hircus (עז הבית)	1	1.6%			
Canis auerus (תן זהוב)	1	1.6%	*Vitis* (ענבים)	3	5.0%
Rodentia (מכרסמים)	1	1.6%	*Olea europae* (זית אירופי)	2	3.3%
יונק לא מזוהה	4	6.7%	*Acacia Victoria* (שיטת ויקטוריה)	2	3.3%
בעלי כנף			*Ziziphus spina-christi* (שיזף מצוי)	2	3.3%
Gallus gallus (תרנגול בית)	1	1.6%	*Triticum*(חיטה)	1	1.6%
Columba Livia domestica (יונת בית)	1	1.6%	*Citrullus lanatus* (אבטיח)	1	1.6%
Galliformes (תרנגולאים)	3	5.0%	זרעים וצומח לא מזוהה	4	6.7%
Passeriformes (ציפורי שיר)	3	5.0%			
בעל כנף לא מזוהה	5	8.3%	**סה"כ פריטים**	60	

זיהוי טקסונומי גנטי:

ב-26 תכני קיבה נמצאו שרידים של בעלי חוליות ועל כן בוצעה הפקת דנ"א משרידים אלו. השרידים הופקו בשתי שיטות הפקה כדי לנסות ולהגדיל את סיכויי ההצלחה. הפקת דנ"א בשיטת גואנדין לא צלחה, מספר הריצופים הטובים היה נמוך (10 ריצופים). ניקוי תוצרי ההפקה ב-Microcon (16 הפקות)

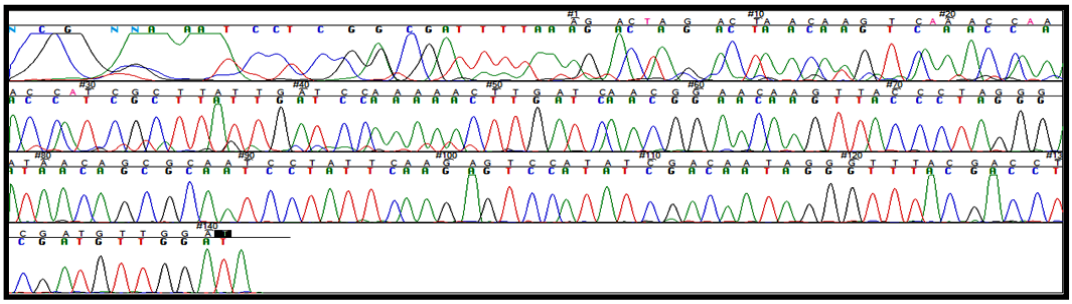
הצליח באופן חלקי עבור 25% מההפקות. עקב זאת, הוחלט לבצע הפקה בשיטת פנול-כלורופורם לכל הדגימות בתקוה שהממיסים האורגניים יפתרו מהמעכבים הקיימים בקיבה. סך הכל בשיטת הפנול-כלורופורם התקבלו 31 ריצופים מוצלחים. במסגרת הפקה זו בוצע ניקיון בשיטת Polyethylene Glycol ל-7 הפקות של רקמות שנלקחו מקיבות בהן נמצא ריכוז גבוהה של חומר צמחי (תהליך הנקיון הצליח ב-14% מההפקות). כל הפקות הדנ"א הוגברו בעזרת שני תחלים אונברסלים להגברת מקטעים קצרים בשני גנים רובוזומאלים (12S RNA= 3Primer ו- 16S RNA= 9Primer), תוצאות הגברת הדנ"א מתוארת באיורים מספר 5 ו-6. היות ונמצאו עופות בקיבות התנים, הדנ"א שהופק הוגבר גם בעזרת תחל ספציפי לעופות (Primer 12sAves). כל תוצרי ההגברות החיוביות נשלחו לריצוף במרכז לטכנולוגיות גנומיות במחלקה למדעי החיים של האוניברסיטה העברית. בסה"כ התקבלו 41 ריצופים באיכות טובה שאפשרו קביעת מין בעל החיים. ברוב המקרים עבור כל דוגמא התקבלו לפחות שני ריצופים שאיפשרו קביעה ודאית של מין בעל החיים. 18 ריצופים התקבלו עם פריימר 3, 14 עם פריימר 9 ו-9 עם פריימר 12sAves. זיהוי של לפחות פריט מזון אחד, באחד מהפריימרים, התקבל ב-21 תכני קיבה מתוך 26 שנבדקו (טבלה מספר 5). במקרים שהדוגמא כללה רק דנ"א של יונקים, ההגברה עם תחל ספציפי לעופות היתה שלילית בכל המקרים.

<u>איור מספר 5:</u> צילום מייצג של אחד מג'לי האגרוז של תוצרי תגובת PCR, שבוצעו במחקר



הרצת PCR זו הינה הרצה של תוצרי הפקת דנ"א בשיטת פנול-כלורופורם. כל דגימה הורצה בשלושת הפרימרים בהן נעשה שימוש במחקר (Primer 3, Primer 9, Primer 12sAves). בהרצה זו, בכל פריימר שונה, הורצו 26 דגימות דנ"א, 1 ביקורת חיוביות, 2 ביקורות שליליות לתהליך ההפקה וביקורת שלילית אחת לתהליך הרצת ה PCR. סה"כ בוצעו 30 הרצות לכל פריימר. מספור הבארות הוא משמאל לימין, כל דוגמא בה חלה הגברה חיובית (מסומנות בצהוב) נשלחה לריצוף.

איור מס' 6: כרומטוגרמה מייצגת של תוכן קיבה שרוצף ואובחן ככבש בית (*Ovis aries*) (פרט J31, Primer 9).



טבלה מספר 5: תוצאות הזיהוי הטקסונומי של בעלי חוליות בשיטת הזיהוי הגנטית

פרט (n=26)	זיהוי טקסונומי גנטי		
	Primer 3	Primer 9	Primer 12sAves
J3	(חתול בית) *Felis catus*	(חתול בית) *Felis catus*	*Columba Livia domestica* (יונת בית)
J5	(תן זהוב) ** *Canis auerus*	(חתול בית) *Felis catus*	N/S
J9	(זאב מצוי) ** *Canis Lupus*	(תרנגול בית) *Gallus gallus*	(תרנגול בית) *Gallus gallus*
J11	N/S	(תן זהוב) ** *Canis auerus*	N/S
J12	(חתול בית) *Felis catus*	(חתול בית) *Felis catus*	*Columba Livia domestica* (יונת בית)
J14	N/S	N/S	N/S
J15	N/S	N/S	N/S
J17	(חתול בית) *Felis catus*	*Vulpes vulpes* (שועל מצוי)	(תרנגול בית) *Gallus gallus*
J18	N/S	N/S	N/S
J19	(זאב מצוי) ** *Canis Lupus*	*Columba Livia* (יונת בית) *domestica*	*Columba Livia domestica* (יונת בית)
J20	(תן זהוב) ** *Canis auerus*	(תרנגול בית) *Gallus gallus*	N/S
J21	(כלב הבית) ** *Canis Lupus familiaris*	N/S	N/S
J22	(זאב מצוי) ** *Canis Lupus*	N/S	N/S
J23	*(שפמנון אפריקאי) Calarias gariepinus*	(זאב מצוי) ** *Canis Lupus*	N/S
J25	N/S	N/S	N/S
J26	(דרבן מצוי) *Hystrix indica*	N/S	(תרנגול הודו) *Meleagris*
J27	(שועל מצוי) *Vulpes vulpes*	N/S	N/S
J28	N/S	*Canis Lupus familiaris* (כלב הבית) **	N/S
J31	*(כבש הבית) Ovis aries*	*(כבש הבית) Ovis aries*	(תרנגול הודו) *Meleagris*
J34	(דרבן מצוי) *Hystrix indica*	N/S	N/S
J36	*(כבש הבית) Ovis aries*	(תן זהוב) ** *Canis auerus*	(תרנגול הודו) *Meleagris*
J38	*(כבש הבית) Ovis aries*	N/S	(תרנגול הודו) *Meleagris*
J40	N/S	*Bovidae* (פרט ממשפחת הפרתיים)	N/S
J43	(דרבן מצוי) *Hystrix indica*	*Canis Lupus familiaris* (כלב הבית) **	N/S
J46	N/S	N/S	N/S
J47	(כלב הבית) ** *Canis Lupus familiaris*	N/S	N/S
מספר ריצופים	18	14	9
N/S	8	12	17

** ריצופים של כלב בית, זאב מצוי או תן זהוב הנחשדים כזיהוי אנדוגני של רקמת קיבה התן.

N/S – לא רוצף.

12 פריטי מזון רוצפו וזוהו כמינים השייכים לקבוצת הזאב ודמויי התן (הכוללות את הזאב המצוי, התן הזהוב וכלב הבית) שבמשפחת הכלביים (טבלה מספר 5). ריצופים אלו נחשדו כריצוף של אפיתל רקמת הקיבה של התן (הרחבה בפרק הדיון). ב-7 מקרים כאלו אובחן פריט מזון שונה מכלבי באותה הפקת דנ"א, בפריימר אחר (למשל בפרט J5: פרימר 3 זיהה תן זהוב ופרימר 9 זיהה חתול בית). נתון זה תומך בסברה שבאותן הפקות הופק דנ"א של הטורף וכן של הנטרף. מכיוון שהמקור להפקת הדנ"א היה מעכל מן הקיבה, אפשרות של הפקת דנ"א של יותר מחיה אחת באותה הפקה, סבירה בהחלט. כמו כן כפי שצויין בפרק החומרים והשיטות, בחלק גדול מהקיבות בוצעה הפקת דנ"א מיותר מרקמה אחת. לאחר ביצוע ראקציית PCR חוזרת לכל מקרה שבו זוהה פרט ממשפחת הכלביים, לא חלו שינויים בזיהוי.

השוואה בין הזיהוי המורפולוגי לזיהוי הגנטי:

רמת ההתאמה בין שיטת הזיהוי המורפולוגית לגנטית בוצעה ע"י ביצוע טבלאות 2X2 וחישוב מקדם ההסכמה למשתנים איכותיים (Kappa). ההתאמה נבחנה למרות העובדה כי הזיהוי המורפולוגי והזיהוי הגנטי במקרים רבים לא בוצעו מאותו חומר (למשל לא הופק דנ"א מקוצי דרבן, נוצות או משערות שלא היו מחוברות לרקמה, אך חומר זה שימש לביצוע הזיהוי המורפולוגי). ביצוע זיהוי מורפולוגי יחד עם זיהוי גנטי, נועד בכדי שהשיטות ישלימו אחת את השנייה ולכן לא היתה צפוייה התאמה רבה.

ההשוואה בוצעה עבור כל הזיהויים מה- 26 הקיבות בהן היו בעלי חוליות (טבלאות מספר 6 ו-7), מכיוון שרק באותן קיבות בוצעה זיהוי מורפולוגי וכן זיהוי גנטי. התאמה לפריטי מזון שאובחנו ככלביים בשיטה הגנטית, בוצעה רק בקיבות בהן לא נמצא פריט מזון אחר, בפריימר שונה.

מתוצאות ההשוואה כפי שהן מתבטאות בטבלה מספר 6, ניתן לראות כי כאשר ישנם שרידים מורפולוגים טיפוסיים ברמת שימור טובה (למשל קוצי דרבן, בזיהוי דרבן מצוי) ישנם יותר מקרי זיהוי מורפולוגי מאשר מקרי זיהוי גנטי של אותו פריט. לעומת זאת כאשר רמת השימור המורפולוגי נמוכה ולא מאשפרת זיהוי מדוייק לרמת המין (למשל נוצות, בזיהוי עופות) יש יותר מקרי זיהוי גנטי ממורפולוגי (טבלה מספר 6). לאחר סכימת כל התוצאות, ה- Kappa הממוצע חושב כ- 0.36, תוצאה הנחשבת לרמת הסכמה סבירה.

<u>טבלה מספר 6:</u> השוואה בין הזיהוי המורפולוגי לגנטי, מספר הזיהויים המשותפים, שכיחות, רווח סמך ברמת בטחון של 95% ומקדם ההסכמה (Kappa) עבור כל פריט מזון.

פריט מזון	כלל הזיהויים	שכיחות קיבות בהן זוהה הפריט	רווח סמך ברמת בטחון של 95%	זיהוי מורפולוגי	זיהוי גנטי	Kappa
Hystrix indica (דרבן מצוי)	8	22.9%	0.104-0.401	8	3	0.45
Ovis aries (כבש הבית)	5	11.4%	0.032-0.267	3	3	0.62
Felis catus(חתול הבית)	4	11.4%	0.032-0.267	2	4	0.63
Vulpes vulpes(שועל מצוי)	2	5.4%	0.007-0.182	2	2	1.00
Bos Taurus (בקר הבית)	2	5.4%	0.007-0.182	2	0	0
Lepus capensis (ארנבת מצויה)	2	5.4%	0.007-0.182	2	0	0
Canis Lupus familiaris (כלב הבית) **	1	2.9%	0.001-0.149	2	3	0.78
Capra hircus hircus(עז הבית)	1	2.9%	0.001-0.149	1	0	0
Canis auerus(תן זהוב) **	1	2.9%	0.001-0.149	1	1	1.00
Canis Lupus(זאב מצוי) **	1	2.9%	0.001-0.149	0	1	0
Meleagris (תרנגול הודו)	4	11.4%	0.032-0.267	0	4	0
Gallus gallus (תרנגול בית)	3	8.6%	0.018-0.231	1	3	0.47
Columba Livia domestica (יונת בית)	3	8.6%	0.018-0.231	1	3	0.47
Testudo graec(צב יבשה מצוי)	1	2.9%	0.001-0.149	1	0	0
Calarias gariepinus שפמנון (אפריקאי)	1	2.9%	0.001-0.149	1	0	0

** התאמה לפריטי מזון שאובחנו ככלביים בשיטה הגנטית, בוצעה רק בקיבות בהן לא זוהה פריט מזון אחר בפריימר שונה.

<u>טבלה מספר 7:</u> דוגמא לטבלת 2X2 לבחינת מקדם הסכמה (Kappa) בין שתי שיטות הזיהוי. טבלאות כאלו הוכנו עבור כל פריט מזון שבטבלה 6, מתוכן חושב מקדם ההסכמה (Kappa). ניתן לראות בדוגמא, שבשתי קיבות מסויימות זוהה חתול בית גם מורפולוגית וגם גנטית, בשתי קיבות אחרות זוהה חתול בית רק בשיטה הגנטית וב-22 הקיבות הנותרות לא זוהה חתול בית באף אחת משיטות הזיהוי .

		קיבות בהן זוהה חתול מורפולוגית	
		כן	לא
קיבות בהן זוהה חתול גנטית	כן	2	2
	לא	0	22
K=0.63			

דיון

מידע לגבי הרכב התזונה ושינויים עונתיים ומרחביים בדיאטה, חיוני בכדי להכיר תהליכים הנדרשים לטובת תכנון תוכנית ממשק אוכלוסיית מין מתפרץ (31). מרבית פריטי המזון שנמצאו בתכולות הקיבה של התנים בשטח המחקר, נמצאו כמושפעים מפעילות אנטרופוגנית ישירה. תצפית זו תואמת לתצפיות אחרות, שעסקו בתזונת התנים באיזורים אחרים (8-12) ולהשערה הקודמת לביצוע המחקר. רב המחקרים העוסקים בתזונת התן בארץ ובעולם מתבססים על אנליזה מורפולוגית של שרידים בצואת התנים (8-12). שיטת מחקר זה הינה בלתי פולשנית ומאפשרת לימוד על המין באופן עקיף. במחקר שלנו, ניצלנו את מדיניות רט"ג לשמירה על מגוון המינים, במסגרתה מתבצע דילול התנים וביססנו את המחקר על אנליזה של תוכן קיבה. שיטת מחקר זו מייצגת באופן מהימן את תזונת התן (ברגע נתון) ומקנה יתרונות של זיהוי פריטים שעשויים להיעלם בעקבות תהליך העיכול. קטגוריית המזון העיקרית שנמצאה במחקר היתה אשפה. תוצאה כזו לא נראתה באף אחד מהמחקרים האחרים, בהן תזונה מאשפה הוזנחה לחלוטין (9,10,11), או שתוארה בשכיחות נמוכה משמעותית ביחס לשכיחות שנמצאה בעבודה זו (8,12). במחקר שבוסס על אנליזת צואה, שנערך לאחרונה בפארק בריטניה בישראל, שכיחות שרידי אשפה שנמצאה בצואת התנים היתה נמוכה (9.1%) וחישוב תרומתה היחסית לביומסה הנצרכת ע"י התנים חושבה כאפסית (0.1%). בדיון בתוצאות המחקר, החוקרים ציינו כי יתכן ועקב העלמות שרידים בתהליך העיכול הם המעיטו בהערכת שכיחותה של האשפה בתזונת התנים בשטח המחקר, אולם הם העריכו כי שכיחותה האמיתית לא היתה גבוהה בהרבה (12). במהלך אנליזת תכני הקיבה במחקר שלנו, נמצאו ממצאים רבים של אשפה בקיבות למשל טונה מקופסאת שימורים או בצק עקב אכילת לחם שלא היו נראים בצואה. מתצפיות אלו ומהפער המשמעותי בשכיחותה של האשפה ביחס למחקרים האחרים, ניתן לשער כי יתכן והשונות נובעת בעיקר משיטות האנליזה השונות ולא עקב שוני בתזונת התנים באיזורי המחקר השונים.

זיהוי פריטי מזון מתכולת קיבה, מאפשר לשייך את תכולת הקיבה לפרטים ספציפים, באופן שאינו אפשרי ע"י אנליזה מצואה ולכן ניתן היה לבחון בעבודה זו גורמי רקע כגון זויג או גיל. גורם הרקע היחיד שנמצא מובהק סטטיסטית הוא הקשר בין גיל צעיר ותזונה מאשפה. ניתן לשער שזמינות של אשפה

תומכת תזונתית בפרטים צעירים שהינם בעלי ניסיון מוגבל בטריפה. תנים צעירים נוהגים לבצע תנועת ארוכת טווח "דיספרסיה" בחפשם אחר טריטוריות במקומות פנויים. זמינות האשפה כפי שנראתה במחקר ושכיחתה בתזונת פרטים צעירים, מהווה כנראה גורם מאיץ לתהליך התפשטותם של התנים.

בסביבות המושפעות מפעילות אנושית, נגישות למזון ממקור אנושי לרוב בעלת גיוון מרחבי המוביל לשונות בהרכב תזונת הכלביים באותם איזורים (31). יתכן והשונות הזו מיוצגת בקשר הקרוב למובהקות סטטיסטית בין תזונה מאשפה לבין איזור המחקר. במובהקת של 0.089 נמצא כי פרטים ברמת הנגב ניזונים בשכיחות רבה יותר מאשפה לעומת פרטים באיזור יער יתיר. יתכן והסיבה לכך שקשר זה לא נמצא ברמת מובהקות גבוהה יותר וכי לא נמצאו קשרים נוספים בין גורמי רקע לתזונת התנים, נובעת מחסרונות שיטת המחקר שכוללות מיעוט בדיגום, פריסה לא אחידה של הדגימות, דגימות אקראיות ובטווחי זמן משתנים. במהלך תקופת המחקר נעשו מאמצים רבים שתכולות הקיבה של רב התנים המדוללים בשטח המחקר יוכנסו למחקר, כאמור מספר זה הגיע ל-47 פרטים בשנתיים. לשם השוואה בשנים 2007-2009 היקף דילול התנים ברמת הגולן בלבד הגיע ל- 1000 עד 1200 פרטים לשנה (32). למרות הפגיעה באיכות המחקר, משיקולים אתים הוקפד כי ביצוע המחקר לא ישפיע על קצב דילול התנים בשטח המחקר, מכאן שלא בוצעו יציאות לשטח לצורך דילול מעבר לפעילותם השגרתית של פקחי רט"ג.

יתרונות שיטת הזיהוי שבוצעה במחקר, כללו זיהוי מירב השרידים בקיבה לרמת המין ומכך התאפשר להבין טוב יותר את התנהגות התנים. השילוב של זיהוי מורפולוגי וזיהוי גנטי הגדיל את סיכויי הזיהוי והבטיח זיהוי מדויק יותר, באופן שלא בוצע עד כה במחקרים אחרים.

בחלק משמעותי מהקיבות נמצאו שרידי יונקים. בדומה לעבודות מיוון וישראל, לא נמצאו שרידים רבים של מכרסמים ויונקים קטנים (10,11,12). תופעה זו, שתוארה גם במחקרים שנערכו באיזורים אחרים, תומכת בתצפית של דולב וחובירו 2010 שתיארה העדר השפעה של הקטנת אוכלוסיית הטורף על אוכלוסיות הטרף. ממצאים אלו תומכים בסברה שהטורפים הפכו תלויים במקורות מזון אנטרופוגניים ולמעשה איבדו חלקית את יכולתם לצוד בטבע (6). חצי משרידי היונקים במחקר אופיינו כשייכים לבעלי חיים מבוייתים, בעיקר של כבש הבית שהוא היונק המשמש הנפוץ ביותר בחקלאות באיזור המחקר. שאר שרידי היונקים אופיינו כשייכים ליונקי בר, כאשר רובם אופיינו כשרידי דרבן מצוי שנמצא כמין בע"ח

המיוצג ביותר בתכני הקיבה במחקר. על פי תצפיות פקחי רשות הטבע והגנים ועל פי הספרות (3,4) ידוע כי באיזורים החקלאים בשטח המחקר מתקימת אוכלוסייה משמעותית של דורבנים המסבה נזקי חקלאות משמעותיים. בהתאם להגדרות העבודה למזון מושפע אנטרופוגנית, הדרבן המצוי נחשב לפריט מזון שאינו נובע מפעילות אנטרופוגנית ישירה אך ללא ספק ריבויי הופעתו בשטח המחקר ולפיכך בתכולות הקיבה של התנים, מושפע מתנאים שמקורם בפעילות אנושית. ידוע כי דרבנים בוגרים נטרפים בישראל ע"י נמרים וצבועים (3). בעת אכילת הדרבן ע"י הטורף הוא אוכל קוצים קטנים אותם הוא מקיא כצנפות. פרטים צעירים נטרפים ע"י טורפים אחרים כזאבים, תנים ואחרים כשהם מתרחקים מאימם (3). בחלק גדול מהקיבות במחקר בהן נמצאו קוצי דרבן, נמצאו קוצים רכים. עובדה זו מתאימה לידוע מהספרות ומעידה כי ככל הנראה מרבית הדרבנים היו פרטים צעירים שנטרפו על ידי התנים. למיטב ידיעתנו זו עבודה ראשונה המתארת שכיחות רבה כל כך של הדרבן המצוי בתזונתו של התן. מכיוון שקוצי הדרבן נפלטים כצנפות, צפוי כי בשיטות זיהוי אחרות המבוססות על אנליזת צואה לא ישארו שרידים המאפשרים את הזיהוי שהתאפשר בשיטה שיושמה במחקר. מאידך, יתכן כי שכיחות קוצי הדרבן שנראתה בעבודה זו הוגברה מעט עקב זמן שהות רב יחסית של קוצים אלו בקיבת התנים עד להקאתם וכן עקב העובדה כי קוצי דרבן הם מאפיין מורפולוגי ברור ולכן ביחס לפריטי מזון אחרים רמת ה-false negative בזיהוי דרבן מצוי מורפולוגית, יחסית נמוכה.

קוצי הדרבן כאמור הם מאפיין אנטומי שקל לזהותו מורפולוגית ובעזרתו לבצע איפיון לרמת המין, אולם במקרים רבים רמת השימור של פריטי המזון בקיבות התנים היתה ירודה והקשתה על זיהוי מדוייק לרמת המין של טרף התן. חלק גדול מהעצמות היו מרוסקות לחלקים קטנים והיוו אתגר לזיהוי. שברי עצמות טיפוסים כאלו נראו גם במחקרים רבים שעסקו באנליזת שרידי עצמות מצואת כלביים (14). גם רמת השימור של נוצות בתכולת הקיבה היתה יחסית ירודה וניתן היה לאפיין מורפולוגית את מרבית שרידי העופות רק לרמת הסדרה בלבד (לדוגמא סדרת ציפורי שיר) על סמך מבנה וגודל הנוצה. במקרים אלה שיטת הזיהוי הגנטי הובילה להצלחה רבה יותר ובעזרתה ניתן היה להדגים בוודאות מלאה את השכיחות הרבה של עופות משק בתזונת התנים. דוגמא בולטת נוספות ליתרונות הזיהוי הגנטי, הינה זיהוי תכולת קיבתו של פרט J23 כשפמנון אפריקאי. מורפולוגית לא הצלחנו לזהות דג זה מכיוון שמין זה

של דג אינו שייך לסביבה הטבעית בישראל. הדג נמצא בקיבתו של תן שנלכד באיזור קיבוץ רביבים, בו מגדלים את הדג לטובת שיווקו לקהל היעד שעיקרו עובדים זרים בישראל.

על אף יתרונותיה שצויינו, שיטת הזיהוי הגנטי של תוכן הקיבה, בו רמת שימור הדנ"א ירודה, קיימים בו חומרים מעכבים ויש בו דנ"א עצמי ממקור אפיתל הקיבה, נמצאה מאוד מאתגרת. תוצאות האנליזה הגנטית זיהתה 14 דגימות כפרטים ממשפחת הכלביים (שועל מצוי, כלב הבית, תן זהוב וזאב מצוי). מכיוון שהדנ"א בעבודה הופק מרקמות ששהו בקיבה של תנים ישנה סבירות רבה שחלק מהדגימות הללו היו מזוהמות בדנ"א עצמי השייך לרקמת האפיתל המצפה את קיבת התן ולחלבונים במיצי הקיבה של התן. זיהוי דנ"א של הטורף באנליזות גנטיות של תוכן קיבה, הינה תופעה שנראתה גם במחקרים אחרים שבחרו בגישה זו (13, 33). משפחת הכלביים כוללת 36 מינים קיימים המחולקים ל- 16 סוגים (34). במחקר שביצע אנליזה מולקולרית מקיפה ביותר של משפחת הכלביים, נעשה שימוש ברצף בעל 2001 זוגות בסיסים, משלושה גנים מיטוכונדריאלים. בהתאם לממצאים המשפחת חולקה ל- 4 קבוצות חד גזעיות שהתפתחו מאותו אב קדמון – קבוצת הזאב ודמויי התן (הכוללות את הזאב המצוי, התן הזהוב וכלב הבית), קבוצת הכלביים דמויי השועל האדום (הכוללת את השועל המצוי), קבוצת השועלים הדרום אמריקאים וקבוצת הזאב בעל הרעמה (Maned wolf) (34). באותו מחקר ניתן לראות כי שונות הרצף בין השועל המצוי לקבוצת הזאב ודמויי התן גבוהה משמעותית יחסית לשונות בין כלב הבית, הזאב המצוי והתן הזהוב שבאותה קבוצה. לכן הזיהוי הגנטי של 2 הדגימות בהן זוהה שועל (בהן גם נמצא שיער של שועל) נחשב כאמין. השונות הקטנה ברצף בין תנים, זאבים וכלבי בית הובילה להשערה שיתכן וזוהה דנ"א עצמי של התן. בנוסף, ב-7 מתוך 12 זיהויים של תן, זאב וכלב בפריימר מסויים, התקבל ריצוף של מין אחר בפריימר אחר באותה דגימה. עובדה זו מעידה שבאותן הפקות הדנ"א, בנוסף לדנ"א של הטרף, נמצא גם דנ"א של הנטרף. בכל הדגימות שבהן רוצף תן, זאב או כלב בוצעה הרצה חוזרת של ראקציית ה- PCR והתוצאות נותרו עקביות לאחר הרצה זו. טריפת נבלות תנים ע"י תנים אחרים, תוארה בעבודות המתארות את תזונת התנים (10, 12) אך לא הופיעה בשכיחות גבוהה. עובדה זו מעלה בספק את אמיתות הזיהוי הגנטי של פריטי מזון כתנים, למעט מקרה יחיד בו נמצאה גם פרווה עם שערות תן בקיבה, אך גם ממצא מורפולוגי זה עשוי לנבוע מליקוק וטיפוח עצמי. זיהוי

קניבליזם דרך שיטות המבוססות על זיהוי דנ"א, אפשרי רק ע"י פיתוח של מרקרים אינדיבידואלים-ספציפים. שימוש במרקר אוניברסלי כשם שנעשה במחקר זה לא מאפשר להפריד בין טורף לבין טרף של אותו מין (32). שכיחותו היחסית נמוכה של הזאב המצוי בדרום ישראל (35) והעובדה שזאבים עשויים להופיע בדיאטת התן רק במסגרת אכילת נבלות, מעמידות גם הן את תוצאות הזיהוי של זאב מצוי ב-5 פריטי מזון בספק רב.

מעבר לבעיית זיהוי דנ"א הטורף, הזיהוי הגנטי של תוכן הקיבה בו רמת שימור הדנ"א ירודה וקיימים בו חומרים מעכבים, חייב שימוש בשתי שיטות הפקת דנ"א, שיטות לניקוי הדנ"א וחזרות על ראקציית ה-PCR. ביצוע הפקה חוזרת של כלל הדגימות בשיטת פנול-כלורופורם נמצא כחיונית ביותר, יתכן שיעור הצלחתה הגבוה משיטת הגואנדין בעבודה זו, נובע עקב ניקיון רב של הדנ"א ממעכבים בעקבות השימוש בממסים רבים (25,26).

מקדם ההסכמה (Kappa) בין שתי שיטות הזיהוי, חושב לכל פריטי מזון ונמצאה רמת הסכמה סבירה. יש לציין שמלכחילה לא תמיד הופק דנ"א מאותם ממצאים שבעזרתם בוצע הזיהוי המורפולוגי למשל מנוצות, קוצי דרבן או שערות לא מחוברות לעור בתוכן הקיבה. עקב עובדה זו מלכתחילה לא היתה צפוייה רמת התאמה גבוהה.

תוצאות המחקר מדגימות היטב את הקשר בין תזונה מפריטי מזון בעלי קשר לפעילות אנושית לבין התפשטותם של התנים דרומה. דילמה משמעותית כאשר מתמודדים עם מין מתפרץ, היא כיצד להפעיל תוכנית ממשק אופטימלית. תוכניות הכוללות אמצעים לחיסול טורפים נמצאות פעמים רבות כלא מעשיות או לא אפקטיביות עקב תגובת פיצוי רבה של אוכלוסיית הטורף (2,31). דילול בירי משפיע ישירות על גודל האוכלוסייה בעוד שסילוק המזון משפיע עליו בעקיפין .הירי אמנם מוריד את גודל האוכלוסייה ,אך עלול להגדיל את קצבי השרידות והגיוס עקב הפחתת התחרות .השפעת הירי (או כל דילול ישיר אחר) היא אם כן לא ליניארית ,ויתכן כי תחת ירי במינון נמוך ,האפקט החיובי מפצה על האפקט השלילי ,והירי אינו אפקטיבי.לעומת זאת סילוק המזון מביא לעליה בתחרות ולכן צפוי להביא לירידה בגודל האוכלוסייה , עקב ירידה זמנית בקצבי הגידול עד להתייצבותה על מספר פרטים נמוך יותר ,בהתאם לכמות המזון

החדשה .ההשפעה היא אם כן ליניארית ככל שתופחת כמות המזון ,תקטן האוכלוסייה– בהתאמה (32). לפיכך תוכניות בקרה וממשק באוכלוסיית הטורפים צריכות להתמקד בהסרת ההפרעות לסביבה שמאפשרות את העלייה בצפיפותם. טיפול זה כולל הפחתת זמינות מזון ממקור אנטרופוגני (31). במחקר של דולב וחובירו 2011 שבוצע ברמת הגולן נבחנה גישה של ויסות אוכלוסיות התנים על ידי דילול לעומת גישה המתמקדת בהפחתת מזון. נראתה עדות לכך שאוכלוסיית התנים הגיבה לסילוק פגרי הבקר במשק בו אלו היוו מקור מזון עיקרי. במשק סמוך בו ישנם מקורות מזון אחרים בנוסף לבקר ,לא נמצאה כל תגובה (32). לעומת זאת תוצאות ניתוח נתוני דילול התנים, הראו שהשרידות נשארה גבוהה וללא שינוי גם כשעוצמת הדילול עלתה, בעוד שקצב הגיוס (שנאמד כפקטור הכפלת האוכלוסייה מהאביב לסתיו בנתוני הספירות) עלה מאוד בתגובה לעלייה בעוצמת הדילול (32).

לסיכום, במחקר הנוכחי נראתה עדות משמעותית שתזונת התן בשטח המחקר מבוססת על פעילות אנושית ולא נמצאו עדויות משמעותיות המראות לחץ על אוכלוסיית טרף טבעית, למעט אוכלוסיית הדרבנים שמהווה מזיק חקלאות ואוכלוסייתם גבוהה מאוד בשטחי המחקר. מכיוון שהקשר בין תזונת התנים לפעילות אנושית בשטח המחקר ניכר, התובנה העיקרית ממחקר זה הינה שבאמצעות הגבלת משאבי מזון אנושיים כמו פסדים ואשפה ניתן יהיה לשלוט באוכלוסיית התנים ולהקטינה. נקיטת גישה זו, שמערבת את כלל הקהילה מהווה פתרון מוסרי ובר-קיימא לבעיה.

1. Macdonlad D.W.: **The Encyclopedia of Mammals**. Oxford University Press, London, 2006.
2. Harding E. K, Doak D. F, Albertson J. D.: **Evaluating the effectiveness of predator control: the non-native red fox as a case study**. Conservation Biology. 4: 1114-1122, 2001.
3. Mendelssohn H, Yom Tov Y.: **Fauna Palaestina- Mammalia of Israel.** Keter Press, Jerusalem, 1999.
4. Mendelssohn H, Yom Tov Y.: **Plants and Animals of the Land of Israel-Mammals**. Misrad Ha Bitahon Press, Jerusalem, 1987.
5. **Israel Nature and National Parks Protection Authority**. http://www.parks.org.il
6. Dolev A, Saltz D, Bino G, Kark S, Yosha D, King R, Ben-Zvi A: **The impact of elevated mammalian predator densities mediated by poultry farming on mammal communities in ecosystems adjacent to poultry farms**.(in Hebrew). Jerusalem: Ministry of Agriculture 2010.
7. Yom Tov Y, Ashkenazi S, Viner O.: **Cattle predation by the Golden Jackal (*Canis aureus*) in the Golan Heights, Israel**. Biological Conservation 73 19-22, 1995.
8. Mukherjee S, Goyal S.P., Johnsingh A.J.T, Leite Pitman M.R.P.: **The importance of rodents in the diet of jungle cat (felis chaus), caracal (Caracal caracal) and golden jackal (Canis aureus) in Sariska Tiger Reserve, Rajasthan, India.** J. Zool., Lond. 262: 405-411, 2004.

9. Lanszki J, Heltai M.: **Feeding habits of golden jackal and red fox in south-western Hungary during winter and spring**. Mamm. biol. 67: 129-136, 2002.

10. Lanszki J, Giannatos G, Heltai M, Legakis A.: **Diet composition of golden jackals during cub-rearing season in Mediterranean marshland in Greece**. Mamm. biol. 74: 72-75, 2009.

11. Giannatos G, Karypidou A, Legaski A, Polymeni R.: **Golden Jackal *(Canis aureus L.)* diet in Southern Greece**. Mamm. biol. 75 227-232, 2010.

12. Borkowski J, ZaleWski A, Manor R.: **Diet consumption of golden jackals in Israel.** Ann. Zool. Fennici 48: 108:118, 2011.

13. Symondson W.O.C.: **Molecular identification of prey in predator diets.** Molecular Ecology 11, 627-641, 2001

14. Lyman R.L.: **Vertebrate Taphonomy**. Cambrige Manuals in Archaeology, 1991.

15. Hebert P.D, Cywinska A, Ball S.L, deWaard J.R.: **Biological identifications through DNA barcodes**. Proc Biol Sci.270(1512):313-21, 2003.

16. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H.: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. Science. 239:487-491, 1988.

17. Weisburg W.S, Barnns S.M, Pelletier D.A, Lane D.J. **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study**. *J.Bacteriol.* 173(2):697, 1991.

18. **The Central Bureau of Statistics (Israel)**. http://www.cbs.gov.il.

19. Bitan A, Rubin S.: **Climate Atlas for Physical and Environmental Planning in Israel**, Ramot Press, Tel Aviv, 1994.

20. Dyce K.M, Sack W.O, Wensing C.J.G.: **Textbook of Veterinary anatomy 3rd edition.** Saunders 2002.

21. Hadoram S.: **The birds of Israel: a complete avifauna and bird atlas of Israel.** London Academic Press 1996.

22. Teerink B.G.: **Hairs of west European mammals**. Cambridge University Press. 1991.

23. Danin A.: **Wild plants of Eretz Israel and their distribution**. Karta, 1998.

24. Boom R, Sol C. J. A, Salimans, M. M. M, Jansen, C. L, Wertheim-van Dillenm P. M. E, van der Noordaa J.: **Rapid and simple methods for purification of nucleic acids.** Journal of Clinical Microbiology 28(3):495-503 1990.

25. Chomczynski P, Sacchi N.: **Single-Step Method of RNA isolation of Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction**. Analytical Biochemistry.162:156-159, 1987

26. Chomczynski P, Sacchi N.: **The Single-Step Method of RNA isolation of Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction: Twenty something years on**. Nature Protocols. 581-585, 2006

27. Goossens M, Kan Y.: **DNA analysis in the diagnosis of hemoglobin disorders.** Methods in Enzymology. 76:805-817,1981.

28. Paithanker K.R, Prasad K.S.N.: **Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol.** Nucleic Acid Research 19:6, 1991.

29. Roca A.L, Bar-Gal G.K, Eizirink E, Helgen K.M, Maria R, Springer M.S, O'Brien S.J, Murphy W.J.: **Mesozoic origin for west Indian insectivores.** Nature 429:649-651, 2004.

30. Waugh, J. **: DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls.** Bioessays. 29(2):188-97, 2007.

31. Baker P.J, Boitani L, Harris S, Saunders G, White P.C.L.: **Terrestrial carnivores and human food production: impact and management**. *Mammals review* 38: 123-166, 2008.

32. Dolev A, Kaputa D, Saltz D, Raichman A, King R.: **Decrease cattle predation risk in pasture**. The Israeli Ministry of Agriculture and the Israeli Nature Reserves Authority 2011.

33. Deagle B.E, Jarman S.N, Pemberton D, Gales N.J.: **Genetic screening for prey in the gut contents from a giant squid (*Architeuthis sp.*)**. *joural of hereditary* 96 (4):417-423 2005.

34. Wayne R.K, Geffen E, Girma D.J, Koepfli K.P, Lau L.M, Marshall C.R.: **Molecular systematic of the canidae**. *Syst. Biol.* 46(4) 622-653,1997.

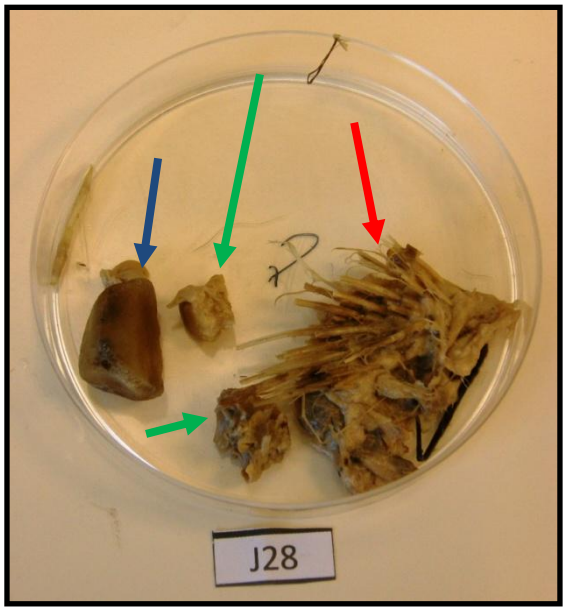
35. Dolev A, Perevolotsky A.: **The red book: Vertebrates in Israel**. Israel Nature and Parks Authority, 2007.

נספח 1': אפיון מורפולוגי

נספח 1.1: זיהוי מורפולוגי באמצעות שרידי עצמות ומאפיינים אנטומיים יחודיים

איור מספר 7 (ימין) ומספר 8 (שמאל): האיורים מהווים דוגמא לביצוע זיהוי מורפולוגי לרמת המין ע"י שימוש בשרידי עצמות ומאפיינים מורפולוגיים יחודיים שנמצאו בתכולת קיבת התנים. עצם השכם (Scapula) שמוצגת באיור מס' 7, נמצאה בקיבת פרט J3. העצם בעלת גודל ומבנה מורפולוגי אופייני המאפשרים לייחסה לגור חתולים (*Felis catus*). איור מס' 8 מציג חלק מתוכן קיבתו של פרט J28. חץ כחול מצביע על עצם הפיקה (Patella) האופיינית לכבש בית צעיר *(Ovis aries)*, חץ אדום מצביע על קוצי דרבן רכים השיכים לפרט צעיר. חצים ירוקים מצביעים על שבריי עצמות כף היד (Phalanges) השייכות ליונק בגודל בינוני, אך לא מזוהה.





נספח 1.2 זיהוי מורפולוגי בעזרת מבנה שיער שנמצא בתוכן קיבת התנים

איור מספר 9: איור זו מהווה דוגמא לזיהוי מורפולוגי של תוכן קיבת התנים בעזרת מבנה השיער. בתמונה זו של שערה שנמצאה בתוכן הקיבה של פרט J46, בעלת מבנה קשקשי קוטיקולה, רוחב הקוטיקולה ומבנה המדולה אופייניים לשיער של כבש הבית *(Ovis aries)*.



נספח 2: איפיון גנטי

נספח 2.1 מספר הפקות הדנ"א מכל דגימה

איור מספר 10 (ימין) ו-11 (שמאל): איור מס' 10 מייצג קיבה שבה אופי התכולה הינו הומוגני ולכן הופק דנ"א מרקמה זו בלבד. באיור מס' 11 אופי התכולה הוא הטרוגני ולכן הופק דנ"א משתי רקמות שונות (החצים הלבנים המסומנים באיור מס' 11, מסמנים איזורי דיגום שונים).





נספח 2.2 ניקיון דגימות בשיטת Microcon

1. הכנסת קולונה למבחנת 2ml.
2. הוספת ddH_2O 50ul מעל ממברנת המיקרוקון.
3. סירכוז למשך 1 דקה במהירות 6rpm.
4. הוספת 50ul מהדנ"א לקולונה.
5. סירכוז למשך 5 דקות במהירות 6rpm.
6. הוספת ddH_2O 100ul לקולונה.
7. סירכוז למשך 5 דקות במהירות 6rpm.
8. העברת הקולונה לאפנדורף 1.5 מ"ל חדש.
9. סיכרוז למשך 3 דקות במהירות 12rpm.
10. הוצאת הקולונה והוספה של ddH_2O 25ul לאפינדורף.

נספח 2.3 ניקיון דגימות בשיטת Polyethylene Glycol :

1. העברת 50ul של דנ"א לאפינדורף 1.5 מ"ל סטרילי.
2. הוספת כמות שווה של בופר Polyethylene Glycol לאפינדורף.
3. אינקובציה ב $37\ ^oC$ למשך 15 דקות.
4. סירכוז למשך 15 דקות במהירות 12000rpm.
5. שפיכת הפרקציה הנוזלית העליונה והוספה של 125ul Ethanol 80%, ניעור המבחנה כך שהנוזל יגע בכל משטחי המבחנה והסרת האתנול. על שלב זה חוזרים פעמיים.
6. נידוף ה- Ethanol ע"י השארת האפינדרוף פתוח למשך 60 דקות.
7. הוספת 50ul ddH_2O ואינקובציה ב $56\ ^oC$ למשך 10 דקות.