ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹
صفحه ۲۰۲ - ۱۹۱

ارزیابی تنوع ژنتیکی و برآورد شاخص‌های تشابه افراد در خرس قهوه‌ای منطقه حفاظت‌شده پرور

Evaluation of genetic diversity and estimation of probability of identity indices in brown bear in Parvar protected area

اشکان اشعریون[۱]، رویا آداودی[۲]، حمیدرضا رضائی[۳]، رسول خسروی[٤]، پرهام دیباج[٥]، پانته‌آ اردانی[٥]، محمد کابلی[*٦]

۱- کارشناس، کمیته ملی حفاظت از خرس‌های ایران، سازمان حفاظت محیط زیست، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکتری، موزه و موسسه جانورشناسی، آکادمی علوم لهستان، لهستان
۳- دانشیار، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گرگان، ایران
٤- استادیار، بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران
٥- به‌ترتیب فارغ التحصیلان کارشناسی ارشد، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
٦- استاد، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

Ashariuon A[1], Adavoudi R[2], Rezaei HR[3], Khosravi R[4], Dibaj P[5], Ardani P[5], Kaboli M[*6]

1- Expert, National Committee for the Conservation of Iranian Bears, Iranian Department of Environment, Tehran, Iran
2- PhD Student, Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Science, Poland
3- Associate Professor, Department of Fishery and Environmental Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Natural Resources and Environmental Engineering, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
5- MSc Graduates, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Environment, Islamic Azad University, Tehran, Iran
6- Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mkaboli@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۱٦ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰٦/۰۲)

چکیده

فشار ناشی از دخالت‌های انسانی در زیستگاه و شکار غیرقانونی سبب شده است که در حال حاضر جمعیت‌های باقی‌مانده خرس قهوه‌ای در ایران به‌صورت جمعیت‌های کوچک و منزوی مشاهده شوند. علی‌رغم نقش به‌سزای این گونه بر سلامت زیست‌بوم‌های طبیعی، اطلاعات بسیار اندکی در خصوص تنوع ژنتیکی و همچنین روابط خویشاوندی بین افراد در جمعیت‌های باقی‌مانده از این گونه در کشور وجود دارد. پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه استخراج دی‌ان‌ای از نمونه‌های غیرتهاجمی، امکان اجرای مطالعات ژنتیک برای گونه‌های آسیب‌پذیر را فراهم آورده‌است. در مطالعه حاضر با استفاده از نمونه‌برداری غیرتهاجمی شاخص‌های تنوع ژنتیکی، احتمال تشابهات ژنتیکی بین افراد و تعداد ژنوتیپ‌های منحصربه فرد شناسایی شده به‌منظور برآورد حداقل تعداد افراد جمعیت خرس قهوه‌ای در منطقه حفاظت شده پرور مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۱۰ نشانگر ریزماهواره با استفاده از دی‌ان‌ای استخراج شده از نمونه‌های سرگین تکثیر شد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۵۱، هتروزیگوستی مورد انتظار ۰/۵۷ و شاخص اطلاعات چندریختی برابر با ۰/۵ محاسبه شد. شاخص تشابه افراد PID (sib) و PID (unbiased) به‌ترتیب برابر با ۰/۰۷۸ و ۰/۰۰۳۲ محاسبه و هم‌چنین تعداد ۱۹ ژنوتیپ منحصر به‌فرد شناسایی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که علی‌رغم کیفیت اندک دی‌ان‌ای استخراج شده از نمونه‌های غیرتهاجمی، نشانگرهای استفاده شده کارایی آماری مناسبی در تمایز نمونه‌ها، ارزیابی احتمال تشابه افراد، و برآورد حداقل اندازه جمعیت دارند. رویکرد استفاده شده در مطالعه حاضر می‌تواند به‌عنوان دستورالعملی در برآورد جمعیت و ارزیابی ارتباطات خوشاوندی گونه‌های جانوری، به‌خصوص گوشت‌خواران در خطر تهدید، با استفاده از روش‌های نمونه‌برداری غیرتهاجمی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
خرس قهوه‌ای
شاخص‌های شناسایی افراد
نمونه‌برداری غیرتهاجمی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

مقدمه

گوشت‌خوران به‌عنوان گونه‌های کلیدی بوم‌سازگان‌ها نقش به‌سزایی در ساختار و پویایی جوامع زیستی دارند، به‌نحویکه حضور و فراوانی این گونه‌ها شاخصی از سلامت یک بوم‌سازگان در نظر گرفته می‌شود (Haskell et al. 2013; Khosravi et al. 2019). از سوی دیگر جثه بزرگ، قرار گیری در رأس هرم غذایی و حساسیت آن‌ها به تغییرات زیستگاهی، پتانسیل این گونه‌ها را به‌عنوان گونه‌های کانونی در یک بوم‌سازگان افزایش داده است (Caro 2010). از این رو، حفاظت از این گونه‌ها می‌تواند متضمن بقای سایر گونه‌های موجود در یک بوم‌سازگان و در نتیجه پایداری درازمدت زیست‌بوم‌ها باشد.

برخورد سه ناحیه جغرافیایی زیستی مهم و تنوع اقلیمی، توپوگرافیکی و زیستگاهی بالا در کشور سبب شده است که غنای بالایی از گوشت‌خواران در زیست‌بوم‌های کشور مشاهده شود. علیرغم غنای گونه‌ای قابل‌توجه گوشت‌خوران، اندازه جمعیت و محدوده پراکنش بسیاری از این گونه‌ها در سال‌های اخیر به‌دلیل تخریب و تکه‌تکه‌شدگی زیستگاه‌ها و شکار بی‌رویه کاهش یافته است (Hemami and Groves 2001; Karami et al. 2016). این امر سبب کاهش ارتباطات زیستگاهی و در نتیجه انزوای جمعیت‌ها شده و خطر تهدیدهای ژنتیکی را برای جمعیت‌های باقیمانده از این گونه‌ها افزایش داده است. اگرچه در سال‌های اخیر برنامه‌های حفاظت از گونه‌های وحشی در کشور سبب احیای جمعیت برخی از گونه‌ها به‌خصوص علف‌خواران شده است (Jowkar et al. 2016; DoE 2019)، اما همواره این سوال مطرح می‌شود که روابط خویشاوندی در جمعیت‌های احیا شده چگونه است؟ به‌عبارت دیگر علاوه بر اهمیت تعداد افراد در زیست‌مندی یک جمعیت، روابط خویشاوندی میان افراد فاکتور مهم دیگر در بقاء دراز مدت یک جمعیت است. روابط خویشاوندی و تشابهات ژنتیکی زیاد بین افراد منجر به بروز تهدیدهای ژنتیکی هم‌چون درون‌آمیزی و رانش ژنتیکی می‌شود که وقوع این تهدیدها در جمعیت‌های کوچک امری اجتناب ناپذیر است (Frankham 2002). در صورت عدم جریان ژنی، مهاجرت و جهش در جمعیت‌های کوچک، تنوع ژنتیکی آن‌ها در طول زمان از دست خواهد رفت. بنابراین تعیین روابط خویشاوندی بین افراد یک جمعیت نقش مهمی در موفقیت برنامه‌های حفاظت از تنوع ژنتیکی گوشت‌خواران و لزوم تقویت جمعیت‌های باقی‌مانده از طریق برنامه‌های انتقال افراد جدید به جمعیت دارد. دقت در تعیین روابط خویشاوندی، شناسایی افراد و تشابهات ژنتیکی بین آن‌ها در یک جمعیت با استفاده از روش‌های غیرتهاجمی بستگی به کیفیت دی‌ان‌ای اسخراج شده از نمونه‌های غیرتهاجمی و همچنین کمیت لازم نشانگرهای استفاده شده در مطالعه دارد (Aziz et al. 2017; Modi et al. 2019).

یکی از روش‌های تخمین روابط خوایشاوندی، استفاده از تکنیک انگشت‌نگاری ژنتیکی[1] است که برای شناسایی و تفکیک افراد جمعیت از یکدیگر بر اساس محتوای ژنی آن‌ها استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر با توجه به توسعه روزافزون روش‌های نمونه‌گیری غیر تهاجمی در مطالعات ژنتیک جمعیت و بوم‌شناسی مولکولی، استفاده از تحلیل‌های انگشت‌نگاری ژنتیکی بیش از پیش در برنامه‌های حفاظت از تنوع زیستی شامل تخمین اندازه جمعیت (Taberlet et al. 1997; Kohn et al. 1999; Woods et al. 1999; Ernest et al. 2000)، پایش اندازه جمعیت در طول زمان (Kendall et al. 1992; Schwartz et al. 1998)، تخمین اندازه گستره خانگی (Taberlet et al. 1997) و شناسایی و تطبیق نمونه‌های به‌دست آمده از شکار غیرقانونی (Waits et al. 1998) مورد توجه قرار گرفته است. روش انگشت‌نگاری ژنتیکی می‌تواند در بسیاری از پژوهش‌ها از جمله ژنتیک حفاظت، بوم‌شناسی رفتار، برآورد جمعیت و تعیین جنسیت، به‌ویژه برای گونه‌های کمیاب و مخفی‌کاری مانند گوشت‌خواران، بسیار سودمند و در مواردی غیرقابل جایگزین باشد (Moqanaki et al. 2013). این روش تاکنون برای برخی از گوشت‌خواران از جمله خرس سیاه (Saito et al. 2008; Draper et al. 2017)، ببر بنگال (Kolipakam et al. 2019; Aziz et al. 2017)، خرس قهوه‌ای (Waits et al. 2001; Graban 2014; Ambarli et al. 2018)، گرگ خاکستری (Granroth-Wilding et al. 2017) و سگ وحشی آسیایی (Modi et al. 2019) استفاده شده است.

در میان گوشت‌خواران بزرگ‌جثه، خرس قهوه‌ای پراکنش به نسبت گسترده‌ای در سطح جهان دارد (Servheen et al. 1999).

[1] DNA fingerprint

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

در دهه‌های اخیر به‌علت تخریب زیستگاه و تغییر کاربری اراضی ناشی از دخالت‌ها و فعالیت‌های انسانی، و تضاد بین این گونه با بومیان، جمعیت خرس‌های قهوه‌ای در برخی از مناطق با آسیب‌های شدیدی روبه‌رو شده و به جمعیت‌های کوچک و منزوی تبدیل شده‌اند (Swenson et al. 2011; Zedrosser et al. 2001; Servheen et al. 1999)، به‌نحویکه در طی ۱۰۰ سال گذشته، تعداد و گستره پراکنش خرس‌های قهوه‌ای در سطح جهان به کمتر از ۵۰ درصد تقلیل پیدا کرده است (Servheen 1990). امروزه جمعیت‌های خرس قهوه‌ای خاورمیانه، بخش عمده‌ای از گسترش پراکنش تاریخی خود را از دست داده‌اند و در حال حاضر در برخی مناطق جمعیت‌های کوچک و منزوی این گونه در خطر انقراض قرار دارند (Calvignac et al. 2009; Ashrafzadeh et al. 2018). در ایران نیز جمعیت‌های خرس قهوه‌ای، به‌دلیل تخریب زیستگاه و فعالیت‌های انسانی به‌صورت جمعیت‌های کوچک و مجزا در محدوده پراکنش آن دیده می‌شود (Ashrafzadeh et al. 2015).

زیرگونه خرس قهوه‌ای موجود در ایران از زیرگونه سوری (*Ursus arctos syriacus*) متعلق به یک کلاد مجزا است که به سه تبار مجزا در البرز، زاگرس و منطقه مرودشت فارس تقسیم می‌شود (Ashrafzadeh et al. 2016). جمعیت آن در ایران به‌دلیل کمبود اطلاعات در برخی از منابع بین ۱۲۰۰ الی ۱۸۰۰ فرد (Sathyakumar and Can 2007)، ۱۰۰ تا ۵۰۰ فرد (Gutleb and Ziaie 1999) و ۳۰۰ تا ۱۵۰۰ فرد (Gutleb et al. 2002) تخمین زده شده است. درحالی‌که هیچ مطالعه علمی در خصوص برآورد جمعیت این گونه در این مناطق و همچنین وضعیت ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین افراد در جمعیت‌های باقی‌مانده صورت نگرفته است (Ashrafzadeh et al. 2016). این موضوع سبب عدم موفقیت برنامه‌های حفاظت از این گونه در کشور شده است. برای تعیین روابط خویشاوندی بین افراد در روش‌های غیرتهاجمی، در درجه اول باید تشابهات ژنتیکی بین نمونه‌های جمع‌آوری شده ارزیابی شود. در همین راستا مطالعه حاضر با هدف استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و نمونه‌برداری غیرتهاجمی به‌منظور: (۱) تعیین تنوع ژنتیکی خرس‌های قهوه‌ای منطقه پرور استان سمنان و (۲) ارزیابی تشابهات ژنتیکی بین افراد با استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر نمونه‌برداری غیرتهاجمی اجرا شد. نتایج این مطالعه می‌تواند به‌عنوان نقطه آغاز چنین پژوهش‌هایی و هم‌چنین یک دستورالعمل برای حفاظت از این گونه جانوری با ارزش در زیستگاه‌های باقی‌مانده آن در کشور مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

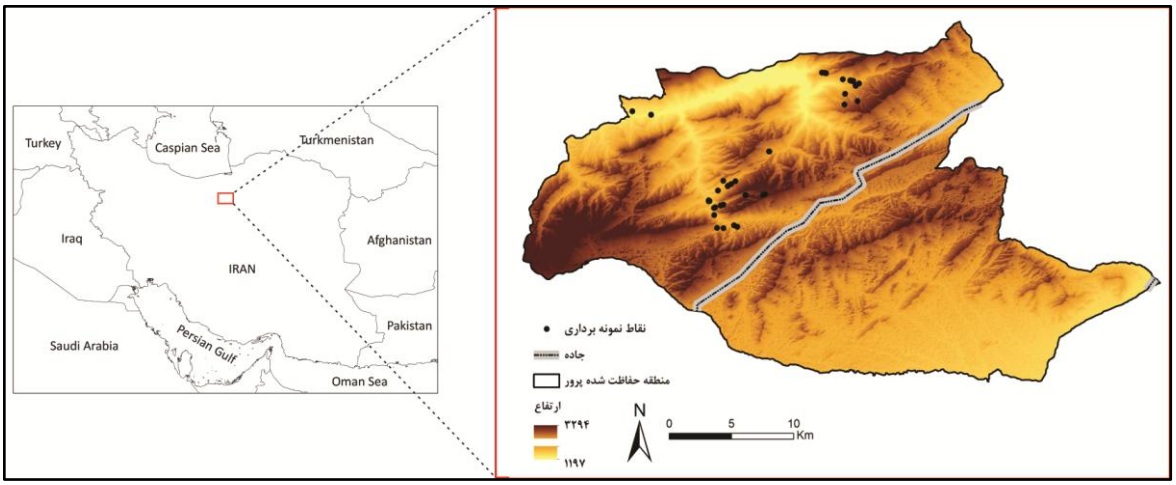
در پژوهش حاضر جمعیت خرس قهوه‌ای در منطقه حفاظت شده پرور به‌عنوان مطالعه موردی مورد بررسی قرار گرفت. این منطقه با وسعت ٦٥ هزار هکتار در طول جغرافیایی ´٢٣ °٥٣ تا ´٤٨ °٥٣ و عرض جغرافیایی ´٥٣ °٣٥ تا ´١٠ °٣٦ در استان سمنان واقع شده است (شکل ۱). منطقه حفاظت‌شده پرور از شمال متأثر از اقلیم خزری و از جنوب تحت تاثیر بادهای گرم و خشک فلات مرکزی ایران است. موقعیت اکوتونی منطقه و وجود زیستگاه‌های متنوع باعث شکل‌گیری تنوع زیستی قابل‌توجهی در این منطقه شده است (Semnan Provincial DoE 2015). در مطالعه حاضر از تکنیک نمونه‌برداری غیر تهاجمی استفاده شد. در خصوص گونه‌های کمیاب و یا در خطر انقراض، نمونه‌گیری از سرگین بهترین و معمول‌ترین روش نمونه‌برداری غیرتهاجمی است که می‌تواند اطلاعات مولکولی با ارزشی را بدون وارد نمودن استرس یا آسیب به فرد و یا زیستگاه فراهم آورد (Farrell et al. 2000; Fernandes et al. 2008). به‌همین منظور در طی سال‌های ١٣٩٦–١٣٩٤ کریدورهای احتمالی جابجایی گوشت‌خواران در منطقه به‌صورت ماهیانه مورد پایش قرار گرفت و در مجموع ٤٣ نمونه سرگین خرس قهوه‌ای جمع‌آوری شد. موقعیت جغرافیایی نمونه‌ها با استفاده از سیستم موقعیت‌یاب جهانی[1] ثبت شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در ظروف حاوی سیلیکاژل و در دمای محیطی قبل از مرحله استخراج نگه‌داری شدند (Taberlet and Luikart 1999).

از آنجاکه احتمال وجود دی‌ان‌ای طعمه در لایه خارجی سرگین اندک است (Wehausen et al. 2004)، لذا برای استخراج دی‌ان‌ای از ۱۰۰ میلی‌گرم لایه خارجی سرگین‌های جمع‌آوری شده استفاده شد. برای جلوگیری از بروز آلودگی‌های احتمالی، استخراج در

[1] Global Positioning System (GPS)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

یک محیط کاملا استریل و با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به‌منظور تعیین کیفیت و کمیت دی‌ان‌ای استخراجی، از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتوفتومتری استفاده شد. در این مطالعه قطعات دی‌ان‌ای مورد نظر در نمونه‌ها با استفاده از ۱۰ جایگاه ژنی ریزماهواره تکثیر شدند (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. هم‌چنین چرخه دمایی برای تکثیر توالی‌ها در ۳۵ سیکل و به‌ترتیب با ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای بین ۵۸ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع آغازگر) و در آخر یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محصول PCR با استفاده از ژل اکریل آمید هشت درصد، الکتروفروز شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از روش نیترات نقره انجام شد. نتایج ژل اکریل آمید با استفاده از دستگاه Gel Doc™ XR عکس‌برداری و با استفاده از نرم‌افزار Gel- Pro Analayzere 6 اندازه‌گیری و شمارش الل‌ها انجام شد.



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی منطقه حفاظت‌شده پرور.

جدول ۱- توالی نشانگرهای استفاده شده به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی خرس قهوه‌ای.

Locus	Forward Primer	Reverse Primer	PCR Product Rang	References
G1D	TCTCTTTTCCTTTAGGGGACTC	CTAGCACCCAGCAAGGTATAATA	123–139 bp	Paetkau and Strobeck 1994
G10B	ATTTTCTTGAGGACTTTTGCATATA	GTTTCTTAACCTCCATCCATACAATACAAC	94–122 bp	Paetkau and Strobeck 1994
G1A	ACCCTGCATACTCTCCTCTGATG	GCACTGTCCTTGCGTAGAAGTGAC	177–195 bp	Paetkau and Strobeck 1994
G10L	CAGGACAGGATATTGACATTGA	GATACAGAAACCTACCCATGCG	166–194 bp	Paetkau and Strobeck 1994
MU10	TTCAGATTTCATCAGTTTGAC	TTTGTATCTTGGTTGTCAGC	133–153 bp	Taberlet et al. 1997
MU23	GCCTGTGTGCTATTTTATCC	GTTTCTTTTGCTTGCCTAGACCACC	164–180 bp	Taberlet et al. 1997
MU05	ATGTGGATACAGTGGAATAGACC	GTTTCTTGTGACATGAACTGAAACTTGTTAT	109–133 bp	Taberlet et al. 1997
MU09	GCCAGCATGTGGGTATATGTGT	GTTTCTTAGCAGCATATTTTTGGCTTTGAAT	98–128 bp	Taberlet et al. 1997
MU15	CATCTGAATTATGCAATTAAACAGC	GTTTCTTGTTTTTGTTTAGCAGGTTTGTCTC	104–120 bp	Taberlet et al. 1997
MU26	GCTGAGAATTCCATTGTATGTAT	ATCTTCTTTACACATAACATACCAT	82–100 bp	Taberlet et al. 1997

بروز الل‌های نول[1] و خطای ناشی از خوانش ژنوتیپ‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است که ممکن است به‌دلیل کیفیت و کمیت پایین دی‌ان‌ای استخراج شده از سرگین باشد (Van Oosterhout et al. 2004; Broquet and Petit 2004) به‌همین منظور، تعیین صحت ژنوتیپ و وجود الل‌های نول با استفاده از نرم‌افزار MICRO-CHECKER 2.2.3 بررسی شد (Van Oosterhout et al. 2004). هم‌چنین به‌منظور تعیین فراوانی الل‌های نول در هر لوکوس از الگوریتم بیشینه درست‌نمائی در نرم‌افزار FreeNA استفاده شد

[1] Null allele

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

(Chapuis and Estoup 2007). انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ و تعادل اتصالی با استفاده از نرم‌افزار GENEPOP انجام شد (Raymond and Rousset 1995). در نهایت شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد الل‌ها به ازای هر لوکوس[1] (Na)، غنای اللی[2] (Ar)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار[3] (HE) و مشاهده شده[4] (HO) با استفاده از نرم‌افزار FSTAT 2.9.3 برای هر یک از لوکوس‌ها محاسبه شد (Goudet 2001).

یکی از موارد احتمال خطا در استفاده از روش‌های غیرتهاجمی در مطالعات ژنتیک، وجود نمونه‌های تکراری از افراد است. به‌دلیل نمونه‌برداری غیرتهاجمی و احتمال وجود نمونه‌های تکراری از افراد، در گام اول با استفاده از تحلیل تشابه افراد[5]، در نرم‌افزار CERVUS 3.0 (Kalinowski et al. 2007) و هم‌چنین با استفاده از تحلیل همسانی ژنوتیپ‌ها[6] در نرم‌افزار GENECAP (Wilberg and Dreher 2004) احتمال تکراری بودن نمونه‌ها و همچنین تعیین ژنوتیپ‌های منحصر به‌فرد به‌عنوان شاخصی از حداقل اندازه جمعیت گونه در منطقه مورد مطالعه بررسی شد. در گام دوم شاخص‌های احتمال تشابه افراد[7] PID (sibs) و PID (unbiased) در نرم‌افزار GIMLET 1.3.3 محاسبه شد (Valiere 2002). از آنجا که بسیاری از تحلیل‌های ژنتیکی از جمله محاسبه شاخص احتمال تشابه افراد تحت تاثیر کمیت، کیفیت و قدرت نشانگرهای استفاده شده هستند (Broquet et al. 2007) و استفاده از نشانگرهای بیش از اندازه باعث افزایش احتمال خطای ژنوتیپی و برآورد بیش از مقدار واقعی اندازه جمعیت (Creel et al. 2003) و همچنین استفاده از نشانگرهای ناکافی نیز باعث عدم محاسبه دقیق شاخص‌های ژنتیکی خواهد شد (Knapp et al. 2009)، لذا شاخص احتمال تشابه افراد در بسیاری از مطالعات به‌منظور برآورد توانایی مجموعه نشانگرهای استفاده شده در شناسایی و تشخیص افراد یک جمعیت محاسبه می‌شوند (Waits et al. 2001).

[1] Number of allele per locus
[2] Allelic richness
[3] Expected heterozygosity
[4] Observed heterozygosity
[5] Identity analysis
[6] Matching genotypes
[7] Probability of identity

به‌منظور افزایش دقت محاسبات، شاخص‌های PID (sibs) و PID (unbiased) در ابتدا برای یک نشانگر و سپس با اضافه کردن گام به گام نشانگرها محاسبه شدند. از آنجایی که نشانگرهای با بیشترین مقدار محتوای اطلاعات چندریختی[8] و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در تحلیل‌های تشابه افراد کاربرد بیشتری دارند (Huang et al. 2015)، در ابتدا نشانگرها بر اساس محتوای اطلاعات چندریختی طبقه‌بندی شدند. بدین‌منظور شاخص محتوای اطلاعات چندریختی برای هر یک از نشانگرها به‌طور جداگانه در نرم‌افزار CERVUS.3 محاسبه شد (Kalinowski et al. 2007). این شاخص میزان سودمندی هر نشانگر را با ارزش‌گذاری محتوای اطلاعات چندریختی آن نشانگر نشان می‌دهد (Barilla 2013). در نهایت شاخص‌های تشابه افراد به‌ترتیب از نشانگر MU23 با بیشترین محتوای اطلاعات چندریختی تا نشانگر MU26 با کمترین میزان اطلاعات محاسبه شد. از آنجاکه در جمعیت‌های کوچک احتمال ورود افراد با روابط خویشاوندی نزدیک (خواهر و برادر) به تحلیل‌ها وجود دارد، از این‌رو شاخص PID (sibs) از طریق ارزیابی قدرت نشانگرهای ریزماهواره برای شناسایی و تفکیک افراد دارای روابط خویشاوندی بسیار نزدیک فرضیات محافظه‌کارانه‌تری را ارائه می‌دهد. شاخص PID (sibs) در تعیین قدرت نشانگرهای استفاده شده در شناسایی افراد کاربرد بیشتری در مقایسه با شاخص PID (unbiased) دارد. مقادیر کمتر از ۰/۰۱ (PID (sib) < 0.01) نشان‌دهنده توانایی کامل نشانگرهای استفاده شده در ارزیابی تشابهات ژنتیکی بین افراد است (Waits et al. 2001). علاوه بر این، در مطالعه حاضر شاخص PID مشاهده شده و مورد انتظار برای ده سناریو مختلف - از کمترین روابط خوایشاوندی تا بیشترین روابط خوایشاوندی - با استفاده از نرم‌افزار API-CALC 1.0 محاسبه شد (Ayres and Overall 2004).

نتایج

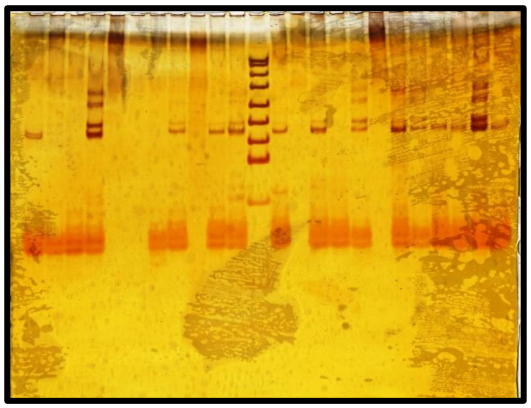
از ۴۳ نمونه سرگین جمع‌آوری شده در منطقه مورد مطالعه، استخراج دی‌ان‌ای برای ۲۳ نمونه با موفقیت صورت گرفت.

[8] Polymorphism Information Content (PIC)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

همچنین از ۱۰ نشانگر ریزماهواره استفاده‌شده نیز، تنها چهار نشانگر G1D (Paetkau and Strobeck 1994)، MU15، MU26 و MU23 (Taberlet et al. 1997) با موفقیت تکثیر شدند (شکل ۲). از شش نشانگر تکثیر نشده، دو نشانگر MU10 و G10B در هیچ‌کدام از نمونه‌ها و چهار نشانگر دیگر (G1A, MU05, MU09, G10L) فقط در برخی از نمونه‌ها تکثیر شدند. از این‌رو این نشانگرها وارد تحلیل‌های بعدی نشدند.

نتایج حاصل از بررسی خطای ژنوتیپی در نرم‌افزار MICRO-CHECKER و FreeNA نشان داد که در هیچ کدام از لوکوس‌ها، خطای خوانش و عدم شناسایی یکی از الل‌های فرد هتروزیگوت[1] به‌دلیل غلظت بسیار پایین دی‌ان‌ای (Taberlet et al. 1999) وجود ندارد. وجود الل‌های نول فقط در یک لوکوس (MU15) مشاهده شد که به احتمال زیاد ناشی از نرخ پایین موفقیت تکثیر یک الل خاص بوده است (جدول ۲).



شکل ۲- تصویر ژل آکریل آمید مربوط به یکی از لوکوس‌های تکثیر شده به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی خرس قهوه‌ای

جدول ۲- فراوانی الل‌های نول با استفاده از نرم افزار FreeNA.

شماره لوکوس	MU23	MU26	MU15	G1D
فراوانی الل نول	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۲٦٦	۰/۰۰۰

تمامی نشانگرها به‌جز لوکوس MU15 از تعادل هاردی واینبرگ پیروی می‌نمودند. انحراف از تعادل هاردی واینبرگ در این لوکوس می‌تواند به‌دلیل وجود الل‌های نول باشد. همچنین بررسی تعادل اتصالی (با در نظر گرفتن شاخص بونفرونی) نشان داد که در هیچ یک از لوکوس‌ها عدم تعادل وجود ندارد و ترکیب الل‌ها در لوکوس‌ها به‌صورت مستقل است. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۵۱ و هتروزیگوستی مورد انتظار ۰/۵۷ برآورد شد. در جدول ۳ شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای جمعیت خرس‌های قهوه‌ای در منطقه مورد مطالعه آورده شده است.

نتایج به‌دست آمده از نرم‌افزار CERVUS نشان داد که از ۲۵۳ مقایسه جفتی ژنوتیپ‌ها، احتمال پنج جفت ژنوتیپ یکسان وجود دارد (PID> 0.01)، هم‌چنین بر اساس تحلیل همسانی ژنوتیپ‌ها در نرم‌افزار GENECAP، از بین ۲۳ ژنوتیپ مورد بررسی، ۱۹ ژنوتیپ منحصر به‌فرد تشخیص داده شد که می‌توان آن را به‌عنوان شاخصی از حداقل اندازه جمعیت خرس قهوه‌ای در منطقه حفاظت‌شده پرور در نظر گرفت. میزان شاخص PIC برای چهار نشانگر استفاده شده بین ۰/۵۸٤تا ۰/٤۳۲ متغیر بود (جدول ۳). بالا بودن شاخص PIC و میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای چهار لوکوس مورد مطالعه (۰/٦٦- ۰/٤۹) نشان می‌دهد که لوکوس‌های تکثیر شده در این مطالعه قابلیت مناسبی برای شناسایی و تشخیص افراد از یکدیگر دارند. شاخص احتمال تشابه افراد PID (sib) و PID (unbiased) برای هر یک از لوکوس‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، با افزایش تعداد نشانگرها، شاخص PID (sib) کاهش چشم‌گیری پیدا می‌کند تا اینکه به پایین‌ترین میزان یعنی ۰/۰۷۸ برسد. از آنجا که شاخص PID (sib) برای چهار نشانگر استفاده شده عددی بزرگ‌تر از ۰/۰۱ را نشان داده (۰/۰۷۸ > ۰/۰۱) و به سطح کمتر از ۰/۰۱ کاهش نیافته است، می‌توان نتیجه گرفت مجموعه چهار نشانگر مورد مطالعه قادر به تشخیص افراد با رابطه خویشاوندی نزدیک به ۹۹/۹۳ درصد بوده‌اند. شاخص PID (unbiased) برای چهار نشانگر مورد استفاده برابر با ۰/۰۰۳۲ تخمین زده شد که نشان می‌دهد در جمعیت‌هایی که به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری شده‌اند از هر ۱۰۰۰ ژنوتیپ مورد بررسی احتمال تشخیص سه ژنوتیپ مشابه یا یکسان وجود دارد.

نتایج به‌دست آمده از نرم‌افزار API-CALC (شکل ٤) نشان می‌دهد که در سناریوی اول (Unrelated: زمانی که بین افراد نمونه‌برداری شده هیچ ارتباط خویشاوندی وجود ندارد)، میزان

[1] Allelic dropout

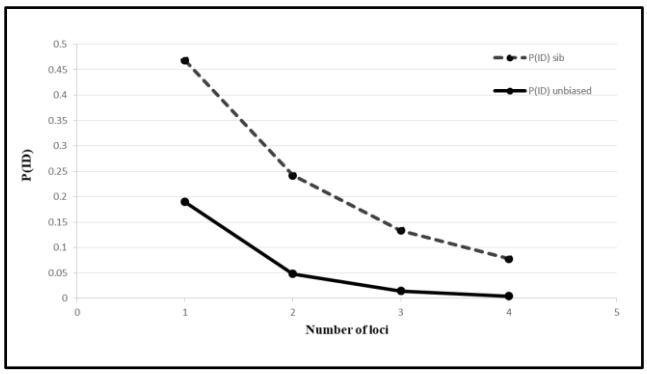
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

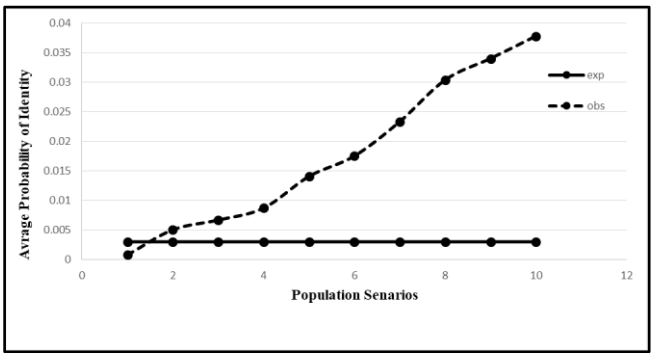
PID_{exp} مورد انتظار نزدیک به صفر است. با افزایش روابط خویشاوندی بین افراد، این شاخص افزایش می‌یابد به‌نحوی‌که برای سناریوی آخر (زمانی که افراد دارای بیشترین روابط خویشاوندی هستند) PID_{exp} برابر با ۰/۰۳۷ برآورد شده است. از سوی دیگر نمودار PID_{obs} مشاهده شده میزان این شاخص را بر اساس نشانگرهای استفاده شده نشان می‌دهد. این شاخص برای هر ۱۰ سناریو عدد ۰/۰۰۳ بوده است. نتایج به‌دست آمده از این دو نمودار نشان می‌دهد در صورتی‌که افراد جمعیت دارای روابط خویشاوندی نزدیک باشند، به نشانگرهای بیشتری برای شناسایی و تشخیص آن‌ها از یکدیگر نیاز خواهد بود.

بحث

انزوای جمعیت بسیاری از گونه‌های جانوری به‌دلیل دخالت‌های مستقیم و غیر مستقیم انسان در زیستگاه و در نتیجه تخریب، تکه‌تکه شدگی، و کاهش کیفیت زیستگاه سبب شده است که مهاجرت افراد بین زیستگاه‌های مختلف با محدودیت‌های زیادی مواجه شود. از این‌رو، جمعیت‌های منزوی با تهدیدهای ژنتیکی زیادی هم‌چون درون‌آمیزی مواجه هستند. نتایج مخرب چنین تهدیداتی می‌تواند منجر به انقراض محلی جمعیت‌ها شود.



شکل ۳- شاخص احتمال تشابه (PID) بر اساس تعداد نشانگرهای استفاده شده. با افزایش نشانگرها، میزان شاخص PID (unbiased) و PID (sib) کاهش پیدا می‌کند.



شکل ٤- شاخص احتمال تشابه افراد (PID). با افزایش روابط خوایشاوندی بین افراد یک جمعیت میزان شاخص PID_{exp} (مورد انتظار) افزایش می‌یابد. شاخص PID_{obs} (مشاهده شده) برای کل سناریوهای در نظر گرفته شده برابر با ۰/۰۰۳ است.

جدول ۳ – نتایج محاسبه تعداد الل‌های هر لوکوس (Na)، غنای اللی (Ar)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (HO)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (HE)، شاخص‌های احتمال تشابه (PID) و شاخص محتوای اطلاعات چندریختی (PIC) در جمعیت خرس قهوه‌ای در منطقه حفاظت‌شده پرور.

Loci	Na	Ar	HO	HE	PID (unbiased)	PID (sib)	PIC
MU23	۳	۳/۰۰	۰/۷۰	۰/٦٦	۰/۱۷۱٦	۰/٤٦۸	۰/٥۸٤
MU26	۳	۲/۹۹	۰/٦٥	۰/٤۹	۰/۰٤۸۷	۰/۲۷۲	۰/٤۳۲
MU15	۳	۳/۰۰	۰/۱۳	۰/٥۹	۰/۰۱۱٤	۰/۱٤۱	۰/٥۰۳
G10	٤	٤/۰۰	۰/٥۷	۰/٥٥	۰/۰۰۳۲	۰/۰۷۸	۰/٤٤۸

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

بنابراین، تعیین روابط خویشاوندی بین افراد یک جمعیت می‌تواند شاخصی از انزوای آن جمعیت باشد و مدیران حفاظت را در اجرای اقدامات ضروری برای کاهش تهدیدات پیش روی جمعیت‌های منزوی همراهی کند.

نمونه‌برداری از گونه‌های جانوری اولین قدم در اجرای مطالعات ژنتیکی در هر سطحی است. تا چندین سال قبل، نمونه‌برداری از حیات وحش عمدتا شامل روش‌های تهاجمی می‌شد. در روش‌های تهاجمی به‌دلیل تماس مستقیم با گونه هدف، احتمال ایجاد استرس و آسیب به گونه و گاهی تغییر در زیستگاه و رفتار جانور وجود دارد. به‌همین دلیل، در سال‌های اخیر استفاده از تکنیک‌های نمونه‌برداری غیرتهاجمی به‌دلیل مزایای زیاد این روش‌ها، تبدیل به یک تکنیک رایج در مطالعات ژنتیک جمعیت شده است (Ferreira et al. 2018; Mengüllüoğlu et al. 2019; Zemanova 2019). شناسایی دقیق نمونه‌های جمع‌آوری شده، اطمینان از صحت نمونه‌ها و عدم حضور نمونه‌های تکراری، و کفایت نشانگرهای مورد استفاده در شناسایی نمونه‌ها مهم‌ترین سؤالاتی است که باید در استفاده از تکنیک‌های نمونه‌برداری غیرتهاجمی به آن پاسخ داده شود (Monterroso et al. 2013; Wang 2016; Ferreira et al. 2018).

یکی از مشکلات استفاده از نمایه‌های زیستی از جمله سرگین، شناسایی و اطمینان از نمایه‌های جمع‌آوری شده است، که اغلب حضور گونه‌های هم‌بوم با نمایه‌های یکسان استفاده از این روش‌ها را با مشکل مواجه می‌کند (Chaves et al. 2012; Ferreira et al. 2018)، در چنین مواردی شناسایی نمایه‌ها از طریق خوانش و اندازه‌گیری طول باند قطعه‌ای از دی‌ان‌ای صورت می‌گیرد (Zamani et al. 2014; Ferreira et al. 2018). در مطالعه حاضر، با توجه به شکل ظاهری بارز سرگین خرس قهوه‌ای و تفاوت آن با سایر گونه‌های هم بوم، شناسایی نمایه‌ها به سهولت و با اطمینان بالایی صورت گرفت. هم‌چنین به‌دلیل استفاده از نشانگرهای اختصاصی خانواده خرس، عدم حضور خویشاوند دیگری از خانواده خرس‌ها در منطقه مورد مطالعه، و عدم اشتراک جایگاهای ژنی مورد استفاده با دیگر گونه‌های حاضر در منطقه، این اطمینان حاصل شد که قطعات ژنی تکثیر شده متعلق به خرس قهوه‌ای است.

از آنجا که شاخص غنای اللی (Ar)، تعداد نمونه‌های هر جمعیت را در برآورد تنوع ژنتیکی در نظر می‌گیرد، از این‌رو این شاخص در مقایسه با شاخص‌های دیگر هم‌چون تعداد الل‌ها و یا هتروزیگوسیتی مشاهده شده، برآورد واقعی‌تری از تنوع ژنتیکی ارائه می‌کند. میانگین غنای اللی به‌دست آمده برای جمعیت خرس قهوه‌ای در منطقه مورد مطالعه ۳/۲۵ برآورد شد که در مقایسه با جمعیت غرب زاگرس (۳/٤۱) تنوع کمتر و در مقایسه با جمعیت فارس (۲/۹۳) تنوع بیشتری نشان داد (Ashrafzadeh et al. 2018). البته باید در نظر داشت که مقایسه شاخص‌های تنوع ژنتیکی در شرایطی قابل اطمینان است که در مطالعات مختلف از مجموعه لوکوس‌های مشابه استفاده شود. از این‌رو مقایسه بین تنوع ژنتیکی به‌دست آمده در مطالعه حاضر با سایر پژوهش‌های انجام شده بر روی خرس قهوه‌ای باید با احتیاط بیشتری صورت گیرد. غنای آللی مناسب در خرس‌های منطقه حفاظت شده پرور می‌تواند به‌دلیل وجود کریدورهای بین زیستگاهی و جریان ژنی بین جمعیت‌های این منطقه با مناطق شمالی‌تر (گلستان و مازندران) باشد که این موضوع نیازمند مطالعات ژنتیکی و ارتباطات سیمای سرزمین در آینده است. تحرک و جابه‌جایی گسترده به‌خصوص در جنس نر و وجود کریدورهای بین زیستگاهی برای این گونه باعث شده است که این گونه علی‌رغم جمعیت‌های کوچک و منزوی، در محدوده‌های وسیعی از کشور پراکنش داشته باشد (Ashrafzadeh et al. 2016). این موضوع خود عاملی برای شکل‌گیری جریان ژن بین جمعیت‌های مناطق مختلف است. مطالعاتی که در خصوص مقایسه تنوع ژنتیکی خرس‌های ایران و دیگر مناطق جهان صورت گرفته است، نشان می‌دهد که جمعیت‌های خرس قهوه‌ای در ایران نسبت به خویشاوندان خود در مناطق دیگر از تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردار هستند (Ashrafzadeh et al. 2018).

محاسبه شاخص‌های احتمال تشابه افراد در نمونه‌های غیرتهاجمی

تا کنون مطالعات بسیاری با استفاده از نمونه‌های غیر تهاجمی (مو، سرگین و غیره) برای برآورد جمعیت و شناسایی افراد گونه‌های وحشی صورت گرفته است (Barilla 2013; Huang et al. 2015; Aziz et al. 2017; Draper et al. 2017; Skrbinšek et al. 2017; Von Thaden et al. 2017; Ambarli et al. 2018; Arandjelovic and Vigilant 2018; Modi et al. 2019). در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

چنین مطالعاتی، کمیت و کیفیت نشانگرهای استفاده شده بسیار حائز اهمیت است. استفاده از تعداد زیادی نشانگر با محتوای اطلاعات چندریختی (PIC) پایین، باعث تخمین اریب جمعیت و عدم شناسایی صحیح افراد و روابط خویشاوندی بین آن‌ها می‌شود (Waits and Leberg 2000; Politov et al. 2015). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که میزان نرخ خطا برای هر نشانگر برابر با یک درصد است. بنابراین در صورت استفاده از تعداد زیاد نشانگر در شناسایی افراد و تخمین اندازه جمعیت، احتمال وجود خطای تعیین ژنوتیپ و برآورد بیش از مقدار واقعی اندازه جمعیت وجود دارد (Taberlet et al. 1997; Huang et al. 2015). از سوی دیگر به‌کارگیری تعداد اندک نشانگر مولکولی با محتوای اطلاعات چندریختی پایین خود می‌تواند سبب بروز خطا در شناسایی افراد، تخمین بیش از مقدار واقعی شاخص‌های روابط خویشاندی بین افراد، و برآورد کمتر از میزان واقعی جمعیت شود (Creel et al. 2009; Huang et al. 2015). از این‌رو حداقل نشانگرهای مورد استفاده باید از توانایی لازم و کافی در شناسایی افراد و تمایز افراد جمعیت برخوردار باشند (Knapp et al. 2009; Kolodziej et al. 2012). به‌طور مثال مطالعه انجام شده بر روی خرس قهوه‌ای در شمال ترکیه نشان داد که در صورت استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهواره، میزان PID_{sib} برابر با $۵/۲ \times ۱۰^{-۵}$ و در صورت استفاده از پنج نشانگر این شاخص برابر با $۷/۷ \times ۱۰^{-۳}$ به‌دست خواهد آمد (Ambarli et al. 2018). هم‌چنین مطالعه انجام شده بر روی پاندا (*Ailuropoda melanoleuca*) در چین (Huang et al. 2015) نشان داد استفاده از شش نشانگر ریزماهواره برای شناسایی دقیق افراد این گونه کفایت می‌کند ($PID_{sib}<0.01$) کفایت می‌کند. پژوهش انجام شده بر روی سیاه خروس (*Tetrao urogallus cantabricus*) در اسپانیا نیز نشان داد که استفاده از حداقل ۷ نشانگر ریزماهواره می‌تواند توانایی لازم در شناسایی افراد را داشته باشد (Morán-Luis et al. 2014). بنابراین ایجاد یک تعادل بین تعداد نشانگرهای استفاده شده (حداکثر تا ۱۰ نشانگر) احتمال ایجاد خطا در شناسایی افراد را کاهش می‌دهد.

از آنجاکه شاخص PID(sib) فرضیات محافظه‌کارانه‌ای دارد، در مطالعه حاضر به‌منظور تعیین نشانگرهای مورد نیاز برای تمایز و احتمال تشابه نمونه‌ها از این شاخص استفاده شد (Krojerová-Prokešová et al. 2019). نتایج نشان داد که مجموع چهار نشانگر مورد استفاده، توانایی لازم برای تمایز ۹۹/۹ درصد از نمونه‌های جمع‌آوری شده را دارند ($PID_{sib} = 0.078$). اگرچه این عدد به کمتر از ۰/۰۱ نرسید اما نشان می‌دهد که مجموعه نشانگرهای استفاده شده امکان شناسایی و تمایز افرادی که در یک جمعیت مستقیما با هم در ارتباط هستند برابر با ۹۹/۹۳ است. این نتایج همچنین نشان می‌دهد که ارزیابی صورت گرفته در ارتباط با احتمال تشابه افراد از نمونه‌های غیرتهاجمی از لحاظ آماری قابل اعتماد است. با این وجود در صورت وجود روابط خوایشاوندی بسیار نزدیک در بین افراد یک جمعت، برای جلوگیری از هر گونه خطا و شناسایی نادرست افراد، پیشنهاد می‌شود از تعداد نشانگر بیشتری با محتوای اطلاعات چندریختی بالا استفاده شود (Waits et al. 2001; Huang et al. 2015; Krojerová-Prokešová et al. 2019).

در مطالعه حاضر تفاوت در منحنی‌های PID_{obs} و PID_{exp} در سناریوهای مختلف نیز به‌دلیل تفاوت در روابط خویشاوندی تعریف شده در مجموعه داده‌ها است. به‌عبارت دیگر، حضور افرادی که دارای روابط خوایشاوندی نزدیک به یکدیگر هستند، به‌دلیل تغییر در زیر ساخت‌های جمعیتی باعث نقض مفروضات معادله نظری PID می‌شود (Donnelly 1995; Krojerová-Prokešová et al. 2019). از عوامل ایجاد انحراف در تخمین شاخص PID می‌توان به عدم تبعیت برخی از لوکوس‌ها از معادله هاردی واینبرگ ناشی از وقایع جمعیت‌شناختی در گذشته و یا ساختاربندی اجتماعی افراد در یک زیستگاه اشاره کرد (Waits et al. 2001). برای مثال، در ارتباط با خرس‌ها، تمایل ماده‌ها به ماندن در زیستگاه مادری یا زیستگاه‌های مجاور آن[1] (Støen et al. 2006; Shirane et al., 2028; Kojola et al. 2020) و عدم تمایل این گونه به قلمروطلبی، و جابه‌جایی و انتشار کمتر جنس ماده ممکن است منجر به نمونه‌برداری از افراد با روابط بسیار نزدیک شود.

اگرچه نرخ موفقیت پایین در تکثیر ریزماهواره‌های استفاده شده امکان برآورد دقیق اندازه جمعیت مؤثر خرس قهوه‌ای را در منطقه

[1] Philopatry

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

مورد مطالعه فراهم نکرد، اما با تکیه بر تحلیل‌های همسانی ژنوتیپ‌ها و احتمال تشابه افراد می‌توان حداقل تعداد افراد جمعیت را برای این گونه در این منطقه تخمین زد. با توجه به اینکه نتایج تحلیل‌های همسانی ژنوتیپ‌های به‌دست آمده از ۲۳ نمونه غیرتهاجمی جمع‌آوری شده نشان از وجود ۱۹ ژنوتیپ منحصربه‌فرد دارد، لذا به‌نظر می‌رسد می‌توان از حضور حداقل ۱۹ فرد در منطقه حفاظت‌شده پرور اطمینان حاصل کرد. برآورد نرخ به نسبت مناسب از تنوع ژنتیکی این گونه در منطقه مورد مطالعه نیز خود گواهی بر اندازه جمعیت مؤثر مناسب این گونه در این منطقه و همچنین احتمال برقراری جریان ژنی مناسب بین این جمعیت با مناطق مجاور است. در مجموع ژنوتیپ‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نمونه‌های غیرتهاجمی را می‌توان به‌عنوان حداقل اندازه جمعیت این گونه در منطقه مورد مطالعه در نظر گرفت. البته با توجه به توان جابه‌جایی بالا در خرس‌های نر، احتمال دارد برخی از ژنوتیپ‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر مربوط به افراد مهاجر به این منطقه باشد. لذا اطمینان از برآورد صورت گرفته در مطالعه حاضر نیازمند اجرای مطالعات بیشتر با استفاده از تعداد نشانگرهای بیشتر و هم‌چنین ترکیب نتایج به‌دست آمده با سایر تکنیک‌های برآورد اندازه جمعیت است. در مجموع می‌توان بیان نمود که در استفاده از روش‌های نمونه‌برداری غیرتهاجمی در مطالعات ژنتیک حفاظت، باید تعداد نشانگرهای انتخاب شده به‌منظور بررسی روابط خویشاوندی بین افراد و ارزیابی تشابه افراد با در نظر گرفتن گونه مورد مطالعه و خصوصیات زیست‌شناختی و بوم‌شناختی آن گونه تعیین شود. مطالعه حاضر نشان داد که دقت در انتخاب نوع نشانگرهای ریزماهواره و هم‌چنین تعداد نشانگرهای استفاده شده، سبب افزایش کارایی تکنیک‌های نمونه‌برداری غیرتهاجمی در مطالعات ژنتیک حیات وحش خواهد شد. چنین مطالعاتی می‌تواند در رابطه با سایر گونه‌های جانوری کشور به‌خصوص گونه‌های در خطر تهدید و انقراض مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

Ambarli H, Mengüllüoğlu D, Fickel J, Förster DW (2018) Population genetics of the main population of brown bears in southwest Asia. Peer-reviewed journal 6: e5660.

Arandjelovic M, Vigilant L (2018) Non-invasive genetic censusing and monitoring of primate populations. American journal of primatology 80: e22743.

Ashrafzadeh M, Kaboli M, Naghavi M, Haghi H, Shakiba M, Rabie K, Ghanipour D, Ansari M (2015) Geographic structure and demographic history of Iranian brown bear (*Ursus arctos*) based on mtDNA control region sequences. Taxonomy and Biosystematics 25: 25- 38. (In Farsi).

Ashrafzadeh MR, Kaboli M, Naghavi MR (2016) Mitochondrial DNA analysis of Iranian brown bears (*Ursus arctos*) reveals new phylogeographic lineage. Mammalian Biology 81: 1-9.

Ashrafzadeh MR, Khosravi R, Ahmadi M, Kaboli M (2018) Landscape heterogeneity and ecological niche isolation shape the distribution of spatial genetic variation in Iranian brown bears, *Ursus arctos* (Carnivora: Ursidae). Mammalian Biology 93: 64-75.

Ayres KL, Overall ADJ (2004) API- CALC 1.0: a computer program for calculating the average probability of identity allowing for substructure, inbreeding and the presence of close relatives. Molecular Ecology Notes 4: 315-318.

Aziz MA, Tollington S, Barlow A, Greenwood C, Goodrich JM, Smith O, Groombridge JJ (2017) Using non-invasively collected genetic data to estimate density and population size of tigers in the Bangladesh Sundarbans. Global ecology and conservation 12: 272-282.

Barilla J (2013) Genetic Tracking of Brown Bear (*Ursus arctos*) in the Belianske Tatry Mountains. Oecologia Montana 22: 13-24.

Broquet T, Ménard N, Petit E (2007) Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. Conservation Genetics 8: 249-260.

Broquet T, Petit E (2004) Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. Molecular Ecology 13: 3601-3608.

Calvignac S, Hughes S, Hänni C (2009) Genetic diversity of endangered brown bear (*Ursus arctos*) populations at the crossroads of Europe, Asia and Africa. Diversity and Distributions 15: 742-750.

Caro T (2010) Conservation by proxy: indicator, umbrella, keystone, flagship, and other surrogate species. Island Press, Washington Dc.

Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution 24: 621-631.

Chaves PB, Graeff VG, Lion MB, Oliveira LR, Eizirik E (2012) DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. Molecular ecology 12: 18-35.

Creel S, Spong G, Sands JL, Rotella J, Zeigle J, Joe L, Murphy K, Smith D (2003) Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. Molecular ecology 12: 2003-2009.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

Creel S, Spong G, Sands JL, Rotella J, Zeigle J, Joe L (2009). Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. Molecular Ecology 12: 2003-2009.
Donnelly P (1995) No independence of matches at different loci in DNA profiles: quantifying the effect of close relatives on the match probability. Heredity 75: 26-34.
Draper JP, Waits LP, Adams JR, Seals CL, Steury TD (2017) Genetic health and population monitoring of two small black bear (*Ursus americanus*) populations in Alabama, with a regional perspective of genetic diversity and exchange. PloS one 12: e0186701.
Ernest H, Penedo M, May B, Syvanen M, Boyce W (2000) Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. Molecular Ecology 9: 433-442.
Farrell LE, Roman J, Sunquist ME (2000) Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. Molecular Ecology 9: 1583-1590.
Fernandes CA, Ginja C, Pereira I, Tenreiro R, Bruford MW, Santos Reis M (2008) Species specific mitochondrial DNA markers for identification of non invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. Conservation Genetic 9: 681-690.
Ferreira CM, Sabino-Marques H, Barbosa S, Costa P, Encarnação C, Alpizar-Jara R, Pita R, Beja P, Mira A (2018) Genetic non-invasive sampling (gNIS) as a cost-effective tool for monitoring elusive small mammals. European Journal of Wildlife Research 64: 46-64.
Frankham R (2002) Population viability analysis. Nature 419: 18-19.
Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. Heredity 86:485-486.
Graban J (2014) Comparison the Brown bear (*Ursus arctos L.*) population genetic characteristics based on the microsatellite markers-'DNA fingerprints' around the world and their application for biotracking. Oecologia Montana 23: 26-36.
Granroth-Wilding H, Primmer C, Lindqvist M, Poutanen J, Thalmann O, Aspi J, Harmoinen J, Kojola I, Laaksonen T (2017) Non-invasive genetic monitoring involving citizen science enables reconstruction of current pack dynamics in a re-establishing wolf population. BMC ecology 17: 44-59
Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ (2002) Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology 11: 309-320.
Gutleb B, Ziaie H (1999) On the distribution and status of the Brown Bear, *Ursus arctos*, and the Asiatic Black Bear, *U. thibetanus*, in Iran. Zoology in the Middle East 18: 5-8.
Haskell DE, Webster CR, Flaspohler DJ, Meyer MW (2013) Relationship between carnivore distribution and landscape features in the northern highlands ecological landscape of Wisconsin. The American Midland Naturalist 169: 1-17.
Hemami MR, Groves CP (2001) Iran. Antelopes. Part 4:114-118.
Huang J, Li YZ, Du LM, Yang B, Shen FJ, Zhang HM, Zhang ZH, Zhang XY, Yue BS (2015) Genome-wide survey and analysis of microsatellites in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), with a focus on the applications of a novel microsatellite marker system. BMC genomics 16: 61.
Jowkar H, Ostrowski S, Tahbaz M, Zahler P (2016) The conservation of biodiversity in Iran: threats, challenges and hopes. Iranian Studies 49: 1065-1077.
Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular ecology 16: 1099-1106.
Karami M, Ghadirian T, Faizolahi K (2016) The Atlas of Mammals of Iran. Jahad Daneshgahi, kharazmi Branch, Iran.
Kendall KC, Metzgar LG, Patterson DA, Steele BM (1992) Power of sign surveys to monitor population trends. Ecological Applications 2: 422-430.
Khosravi R, Hemami MR, Cushman SA (2019) Multi-scale niche modeling of three sympatric felids of conservation importance in central Iran. Landscape Ecology 34: 2451-2467.
Knapp SM, Craig BA, Waits LP (2009) Incorporating Genotyping Error into Non-Invasive DNA-Based Mark—Recapture Population Estimates. The Journal of Wildlife Management 73: 598-604.
Kohn MH, York EC, Kamradt DA, Haught G, Sauvajot RM, Wayne RK (1999) Estimating population size by genotyping faeces. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 266: 657-663.
Kojola I, Hallikainen V, Heikkinen S, Nivala V (2020) Has the sex-specific structure of Finland's brown bear population changed during 21 years?. Wildlife Biology 2: 1-8.
Kolipakam V, Singh S, Pant B, Qureshi Q, Jhala YV (2019) Genetic structure of tigers (*Panthera tigris tigris*) in India and its implications for conservation. Global Ecology and Conservation 20: e00710.
Kolodziej K, Theissinger K, Brün J, Schulz HK, Schulz R (2012) Determination of the minimum number of microsatellite markers for individual genotyping in wild boar (*Sus scrofa*) using a test with close relatives. European journal of wildlife research 58: 621-628.
Krojerová-Prokešová J, Turbaková B, Jelenčič M, Bojda M, Kutal M, Skrbinšek T, Koubek P, Bryja J (2019) Genetic constraints of population expansion of the Carpathian lynx at the western edge of its native distribution range in Central Europe. Heredity 122: 785-799.
Mengüllüoğlu D, Fickel J, Hofer H, Förster DW (2019) Non-invasive faecal sampling reveals spatial organization and improves measures of genetic diversity for the conservation assessment of territorial species: *Caucasian lynx* as a case species. PloS one 14(5).
Modi S, Habib B, Ghaskadbi P, Nigam P, Mondol S (2019) Standardization and validation of a panel of cross-species microsatellites to individually identify the Asiatic wild dog (*Cuon alpinus*). Peer-reviewed journal 7: e7453.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]

Monterroso P, Castro D, Silva TL, Ferreras P, Godinho R, Alves PC (2013) Factors affecting the (in) accuracy of mammalian mesocarnivore scat identification in South-western Europe. Journal of zoology 289: 243-250.
Moqanaki EM, Breitenmoser U, Kiabi BH, Masoud M, Bensch S (2013) Persian leopards in the Iranian Caucasus: a sinking 'source'population. Cat News 59: 22-25.
Morán-Luis, M, Fameli A, Blanco-Fontao B, Fernandez-Gil A, Rodriguez-Munoz A, Quevedo M, Mirol P, Banuelos MJ (2014) Demographic status and genetic tagging of endangered capercaillie in NW Spain. PloS one 9.
Paetkau D, Strobeck C (1994) Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. Molecular ecology 3: 489-495.
Politov DV, Belokon MM, Belokon YS, Polyakova TA, Shatokhina AV, Mudrik EA, Azarova AB, Filippov MV, Shestibratov KA (2015) Application of microsatellite loci for molecular identification of elite genotypes, analysis of clonality, and genetic diversity in aspen *Populus tremula* L.(Salicaceae). International journal of plant genomics 1-12.
Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. Evolution 49: 1283-1286.
Saito M, Yamauchi K, Aoi T (2008) Individual identification of Asiatic black bears using extracted DNA from damaged crops. Ursus, 19: 162-168.
Sathyakumar S, Can ÖE (2007) News and status of South Asian brown bears. International Bear News 16: 6-9.
Schwartz M, Tallmon D, Luikart G (1998) Review of DNA-based census and effective population size estimators. Animal Conservation 1: 293-299.
Servheen C (1990) The status and conservation of the bears of the world. In: International Conference on Bear Research and Management. Monogram 2: 32.
Servheen C, Herrero S, Peyton B (1999) Bears. Status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Bear and Polar Bear Specialist Groups. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
Shirane Y, Shimozuru M, Yamanaka M, Tsuruga H, Hirano S, Nagano N, Moriwaki J, Nakanishi M, Ishinazaka T, Nose T, Kasai S (2018) Sex-biased natal dispersal in Hokkaido brown bears revealed through mitochondrial DNA analysis. European Journal of Wildlife Research 64: 65-75.
Skrbinšek T, Jelenčič M, Luštrik R, Konec M, Boljte B, Jerina K, Černe R, Jonozovič M, Bartol M, Huber D, Huber J, Reljić S, Kos I (2017) Genetic estimates of census and effective population sizes of brown bears in Northern Dinaric mountains and Southeastern Alps: Report.
Støen OG, Zedrosser A, Wegge P, Swenson JE (2006) Socially induced delayed primiparity in brown bears *Ursus arctos*. Behavioral Ecology and Sociobiology 61(1): 1-8.
Swenson JE, Taberlet P, Bellemain E (2011) Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos*. Mammal Review 41: 87-98.
Taberlet P, Camarra JJ, Griffin S, Uhres E, Hanotte O, Waits LP, Dubois-Paganon C, Burke T, Bouvet J (1997) Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. Molecular ecology 6: 869-876.
Taberlet P, Waits LP, Luikart G (1999) Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends in ecology & evolution 14: 323-327.
Valière N (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. Molecular Ecology Notes 2: 377-379.
Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4: 535-538.
von Thaden A, Cocchiararo B, Jarausch A, Jüngling H, Karamanlidis AA, Tiesmeyer A, Nowak C, Muñoz-Fuentes V (2017) Assessing SNP genotyping of noninvasively collected wildlife samples using microfluidic arrays. Scientific reports 7: 10768.
Waits JL, Leberg PL (2000) Biases associated with population estimation using molecular tagging. In Animal Conservation forum 3: 191- 199. Cambridge University Press.
Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. Molecular ecology 10: 249-256.
Waits LP, Paetkau D, Strobeck C (1998) The genetics of the bears of the world. In: Bear Conservation Act. In: Servheen C (Ed.) IUCN, Gland 25- 32.
Wang J (2016) Individual identification from genetic marker data: Developments and accuracy comparisons of methods. Molecular Ecology Resources 16: 163-175.
Wehausen JD, Ramey R, Epps CW (2004) Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: the importance of DNA extraction method. Journal of Heredity 95: 503-509.
Wilberg MJ, Dreher BP (2004) Genecap: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. Molecular Ecology Notes 4: 783-785.
Woods JG, Paetkau D, Lewis D, McLellan BN, Proctor M, Strobeck C (1999) Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. Wildlife Society Bulletin 27: 616-627.
Zamani Z, Rezaee HR, Aghile SM, Asade M, Shabane A, Zamane N (2014) Species Identification in Large Carnivores Based on Mitochondrial DNA Length Polymorphism. Environmental Researches 10: 211- 217. (In Farsi).
Zedrosser A, Dahle B, Swenson JE, Gerstl, N (2001) Status and management of the brown bear in Europe. *Ursus* 12: 9-20.
Zemanova MA (2019) Poor implementation of non-invasive sampling in wildlife genetics studies. Rethinking Ecology 4: 119-132.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.5.0]