



محاسبه اندازه جمعیت موثر و تخمین اندازه جمعیت کل، با استفاده از توالی‌یابی ژنوم میتوکندری در گرگ‌های استان‌های همدان، قزوین و زنجان

مرضیه اسدی آق‌بلاغی^۱، محمد کابلی^{۲*}، حمیدرضا رضایی^۳، ندا بهداروند^۴، رسول خسروی^۵

^۱ دانشجوی دکتری رشته محیط زیست دانشگاه شهید بهشتی

^۲ دانشیار دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

^۳ استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۴ دانشجوی دکتری رشته محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۵ دانشجوی دکتری رشته محیط زیست دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۳۰

چکیده

با وجود اینکه گرگ‌ها توانایی زیستن در انواع زیستگاه‌ها را دارند، اما در سال‌های اخیر در اکثر مناطق کشور جمعیت آن‌ها به شدت کاهش یافته و در برخی مناطق به طور کامل نابود شده است. لذا اجرای برنامه‌های حفاظتی در این راستا ضروری است. اجرای برنامه‌های مدیریت حیات وحش وابسته به تخمین اندازه جمعیت است. در سال‌های اخیر با گسترش بوم‌شناسی مولکولی می‌توان با استفاده از روش‌های ژنتیکی اندازه جمعیت را با دقت بیشتری نسبت به روش‌های سنتی برآورد کرد. با توجه به اینکه ژنوم میتوکندری به عنوان یک نشانگر قوی در پیش‌بینی تغییرات جمعیت در حیوانات وحشی و محاسبه اندازه جمعیت موثر افراد ماده بکار برده می‌شود، در این مطالعه با استفاده از این نشانگر اندازه جمعیت موثر (N_e) افراد ماده در استان‌های همدان، قزوین، زنجان حدود ۴۵ قلاده برآورد شد که با در نظر گرفتن نسبت جنسی یک به یک در گرگ‌ها و همچنین نسبت اندازه جمعیت موثر به اندازه جمعیت کل (N_e/N) اندازه جمعیت کل بین ۹۰ تا ۳۶۰ قلاده در این استان‌ها محاسبه شد.

کلمات کلیدی: ژنوم میتوکندری، گرگ، اندازه جمعیت موثر، اندازه جمعیت کل

مقدمه

جمعیت در زیستگاه مربوطه روی آورده‌اند
(Solberg et al., 2006).

تحقیقات نشان داده است که جایگاه های موجود روی کروموزوم ها مسئول تغییرات در صفات مهم اقتصادی هستند (Kharrati koopaei & Mohammadabadi, 2013) و در سال های اخیر زیست شناسی ملکولی تحولی شگرف در تحقیقات بوم شناسی پدید آورده است. از آنجا که برآورد اندازه جمعیت و اندازه جمعیت موثر از داده های جمعیت شناختی دشوار است، می توان اطلاعات با ارزشی را از ساختار جمعیتها با استفاده از روش های ژنتیکی، بکارگیری نظریه یگپارچگی^۱، آزمون بیسین^۲ و آزمون حداکثر احتمال^۳ به دست آورد (Walpes, 2006; Peng & Zhang, 2011; Drummond et al., 2005). در پژوهشی، Solberg et al. (2006) با استفاده از دو روش سنتی ثبت نمایه های حضور و بررسی هوایی با استفاده از بالگرد و همچنین روش نوین بررسی جایگاه های ریزماهواره، اندازه جمعیت خرس را در جنوب سوئد محاسبه کردند. نتایج آن ها نشان داد که برآورد جمعیت با استفاده از روش های ژنتیکی نتایج دقیق تری ارائه می دهد (Solberg et al., 2006).

اخیرا مفهوم اندازه جمعیت موثر در زیست شناسی حفاظت بکار برده می شود. اندازه جمعیت موثر یگپارچگی اثرات ژنتیکی و تاریخچه تغییرات جمعیت را در طی تکامل بیان

گرگ خاکستری (*Canis lupus*) بزرگترین عضو خانواده سگ سانان است و در آسیا، اروپا و آمریکای شمالی گسترش زیادی دارد (Mech & Boitani, 2003). اگر چه گرگ ها توانایی زیستن در انواع زیستگاه ها را دارند، با این وجود در سال های اخیر در اکثر مناطق کشور جمعیت آن ها به شدت کاهش یافته و در برخی مناطق به طور کامل نابود شده است (Ziaei, 2009). آگاهی از اندازه جمعیت های حیات وحش و به ویژه گونه های در خطر انقراض، نادر و کمیاب یکی از مهمترین اطلاعات مورد نیاز در فرآیند مدیریت و حفاظت از این دسته گونه ها محسوب می شود، به نحوی که اتحادیه جهانی حفاظت^۱ اندازه جمعیت را به عنوان یک فاکتور کلیدی در تعیین گونه های در خطر انقراض مورد استفاده قرار می دهد (Freeland, 2005). لذا مدیریت حیات وحش وابسته به تعیین یا تخمین دقیق اندازه جمعیت است (Wesley et al., 2000; Solberg et al., 2006). روش های متفاوتی برای محاسبه اندازه جمعیت وجود دارد. از جمله روش های سنتی می توان به روش صید و علامت گذاری، روش جالی-سیبر و شمارش های هوایی اشاره کرد (Krebs, 1999). این روش ها معمولا دشوار و پرهزینه هستند و در مواردی نیز به سلامتی افراد مورد مطالعه آسیب می رسانند. برخی متخصصان نیز به رویکردهای دیگری از قبیل تخمین اندازه جمعیت براساس ثبت نمایه های حضور افراد

^۱ Coalescent^۲ Bayesian^۳ Maximum likelihood^۱ IUCN

استفاده از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری ۳۷۵ فرد از قاره‌های مختلف و با بکارگیری نظریه یکپارچگی و آزمون بیسین، اندازه جمعیت موثر انسان در تمامی قاره‌ها محاسبه شد، سپس براساس اندازه جمعیت موثر روند تغییرات اندازه جمعیت انسان در طی صد هزار سال گذشته در تمامی قاره‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Atkinson et al., 2008).

در سال‌های اخیر تضاد بین گرگ و جوامع بومی در محدوده استان‌های همدان، قزوین و زنجان در حال افزایش است و گزارشات متعددی از حملات گرگ به دام‌های اهلی و انسان در مناطق مذکور ثبت شده است. واکنش جوامع بومی به این تقابل رو به افزایش نیز اقدام به کشتن گرگ‌ها است که می‌تواند به انقراض محلی جمعیت گرگ‌ها در این مناطق بیانجامد. در این مطالعه تلاش شد تا با استفاده از نشانگر ژنوم میتوکندری اندازه جمعیت موثر گرگ و اندازه جمعیت کل در محدوده استان‌های همدان، قزوین و زنجان برآورد گردد تا برای مدیران فنی در شبکه حفاظت از تنوع زیستی به عنوان ابزاری برای تصمیم‌گیری‌ها بکار آید.

مواد و روش‌ها

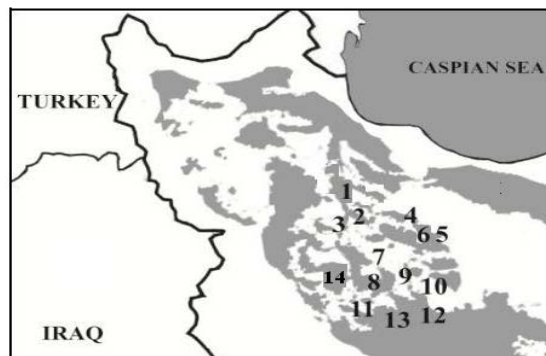
با همکاری سازمان حفاظت محیط زیست (۱۳۸۸-۱۳۹۰) از ۱۴ قلاده گرگ از محدوده استان‌های همدان، زنجان و قزوین نمونه بافت ماهیچه تهیه شد. نمونه‌ها شامل گرگ‌های شکار شده توسط مردم بومی، تلفات جاده‌ای و لاشه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف این استان‌ها بود (شکل ۱). به نظر می‌رسد که علیرغم

می‌کند (Hare et al., 2011; Walpes, 2006). در طی مطالعه‌ای که با استفاده از توالی ژنوم میتوکندری در خصوص کل و بز وحشی در ایران صورت گرفت، اندازه جمعیت موثر به عنوان نمایه‌ای از رشد جمعیت گونه کل و بز وحشی در ایران محاسبه شد (Naderi et al., 2008). نسبت بین اندازه جمعیت موثر به اندازه جمعیت کل (N_e/N) بین یک درصد تا ۰/۲۵ درصد در جمعیت گونه‌های مختلف متغیر است (Frankham, 2000). در سطح دنیا پژوهش‌های گوناگونی در رابطه با برآورد اندازه جمعیت موثر انجام شده است، چنانچه در کشور فنلاند با بکارگیری ۱۰ جایگاه ریزماهواره نوسانات اندازه جمعیت موثر گرگ با استفاده از بررسی تغییرات فصلی فراوانی آلل‌ها محاسبه گردید (Aspi et al., 2008).

با توجه به این که ژنوم میتوکندری دارای تعداد زیادی نسخه در هر سلول است و بدون هیچ‌گونه تغییری از مادر به فرزند منتقل می‌شود، قادر است تا فرآیندهای جمعیت‌شناختی موثر بر جمعیت مانند گسترش جمعیت و یا تاریخچه آن‌ها را بیان نموده و به عنوان یک نشانگر قوی در پیش‌بینی تغییرات جمعیت در حیوانات وحشی و محاسبه اندازه جمعیت موثر افراد ماده، به ویژه بر اساس تغییرات در طی زمان بکار برده می‌شود (Atkinson et al., 2008; Zhang et al., 2003; Tallmon et al., 2007; Naderi et al., 2008; Bollongino et al., 2012; AsadiAghbolaghi^a et al., 2014; Zamani et al., 2015). مطالعات متعددی در این زمینه در گونه‌های مختلف انجام شده است از جمله، با

از بانک ژن این سازمان به دست آمد. نمونه‌های بافت ابتدا در الکل و سپس در سیلیکاژل قرار داده شدند و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند.

تعداد بالای شکار غیر قانونی گرگ‌ها در مناطق مختلف کشور، لاشه‌ها به موزه و یا بانک ژن سازمان حفاظت محیط زیست ارسال نشده و سریعاً معدوم می‌گردد، لذا فقط تعداد دو نمونه



شکل ۱- موقعیت مناطق نمونه برداری.

Figure 1- Location of sampling.

استخراج DNA با استفاده از کیت (AccuPrep) صورت گرفت. DNA استخراجی تا زمان PCR^۱ در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی نیز با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، الکتروفورز و توالی‌یابی

ابتدا از آغازگرهای پیشرو L-pro و آغازگر پسرو H-phe استفاده شد (Douzery & Randi, 1997) که پیش بینی می‌شد یک قطعه حدود ۱۵۰۰-۱۴۰۰ جفت باز تولید کنند (جدول ۱). تکثیر جایگاه ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل ۲۰ نانوگرم DNA، یک واحد بین‌المللی tag

همچنین از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری دو نمونه گرگ، یکی متعلق به استان قزوین (AY570180) و دیگری متعلق به استان همدان (AY570181) که در پایگاه ژن‌بانک^۱ ثبت شده بودند (Ardalan *et al.*, 2011) نیز در تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد (توالی این دو نمونه با توالی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه هم‌پوشانی کامل داشتند)، بنابراین تعداد کل نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه ۱۶ نمونه بود که بنا بر مرور منابع صورت گرفته این تعداد نمونه جهت اندازه جمعیت موثر مناسب می‌باشد (Kalinowski *et al.*, 2002; Tallmon *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 2008).

^۱ Polymerase chain reaction

^۱ NCBI

نوکلئوتیدی و تعداد جایگاه‌های پلی‌مورف با استفاده از نرم افزار دی‌ان‌ای اسپی^۵ برآورد شد. در نرم‌افزار بیوتی^۶ با استفاده از نظریه یکپارچگی و انتخاب مدل^۷ GTR، آزمون بیسین و تکرار ۱۲۰ میلیونی زنجیره مارکوف^۸ فایل ورودی نرم افزار بیست^۹ تهیه شد. سپس بر اساس پارامترهای انتخاب شده در نرم‌افزار بیوتی و حدود اطمینان ۹۵ درصد، آنالیز محاسبه اندازه جمعیت موثر در نرم افزار بیست اجرا شد. در نهایت نتایج در نرم افزار تریسر^{۱۰} مورد مشاهده قرار گرفتند و نمودارهای مربوطه با استفاده از نظریه یکپارچگی و مدل رشد منطقی^{۱۱} ترسیم شدند (Drummond et al., 2007).

بر اساس نظریه یکپارچگی اندازه جمعیت موثر با استفاده از نشانگرها هاپلوئید mtDNA طبق رابطه زیر برآورد می‌گردد (Wakeley & Sargsyan, 2009):

معادله ۱

$$\theta = 2 \cdot N_e \cdot \mu$$

$$N_e = \text{اندازه جمعیت موثر افراد ماده}$$

$$m = \mu \cdot \text{طول توالی}, \mu = \text{نرخ جهش در}$$

هرنسل.

DNA پلی‌مراز، بافر PCRx ۱، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها و آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. سپس محصول PCR این آغازگرها توسط آغازگر پیشرو L-pro و آغازگر H-576 (Randi et al., 2000) مجدداً PCR شد و یک قطعه حدود ۶۰۰ جفت باز تشکیل شد. چرخه دمایی برای تکثیر ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری عبارت بود از: ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه، شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه و بسط نهایی با ۷۲ درجه در ۵ دقیقه. خالص‌سازی^۱ محصولات PCR با استفاده از برش از روی ژل آگاروز انجام شد، سپس محصول PCR جهت توالی‌یابی از طریق شرکت تکاپوزیست به کشور کره جنوبی ارسال گردید و توالی‌یابی با استفاده از دستگاه مدل Applied Biosystems 3730xl/Bioneer 3730xl انجام شد. توالی‌های مزبور در پایگاه ژن‌بانک ثبت گردیدند (AsadiAghbolaghi^b et al., 2014).

(KC540917, KC540918, KC540919, KC540920, KC540925, KC540922, KC540927, KC540928, KC540929).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای سک اسکپ^۲ و مگا^۳ ویرایش شدند. تعداد هاپلوئیدها با استفاده از نرم افزار آرلکوین^۴ تعیین شدند و میران تنوع هاپلوئیدی، تنوع

^۴DnaSp

^۵Bautil.4

^۶General Time Reversible

^۷Markov chain Monte Carlo

^۸Beast1.4.6

^۹Tracer1.5

^{۱۱}Logestic growth

^۱Purification

^۲Seqscape2.7

^۳MEGA.5

^۴Arlequin 3.11

جدول ۱- توالی‌ها آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری.

Table 1- Sequences of the used primers for produce mitochondrial control region.

آغازگر	توالی
Primer	Sequence
L-Pro	5'-CGTCAGTCTCACCATCAACCCCAAAGC-3'
H-phe	5'-GGGAGACTCATCTAGGCATTTTCAGTG-3'
H-576	5'-TTTGACTGCATTAGGGCCGCGACGG-3'

نتایج

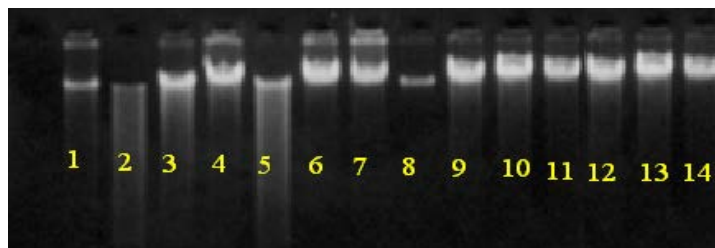
بررسی کیفیت DNA استخراجی

نتیجه حاصل از بررسی DNAهای استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که DNAهای استخراج شده دارای کمیت و کیفیت قابل قبولی برای استفاده در واکنش زنجیره پلی‌مراز هستند شکل (۲). در روش اسپکتوفتومتر میزان جذب در طول موج ۲۶۰nm و ۲۸۰nm با استفاده از دستگاه بیوفتومتر محاسبه شد. نمونه‌هایی که این نسبت برای آن‌ها در دامنه ۱/۸ تا ۲ قرار داشت قابل قبول و برای سایر نمونه‌ها استخراج مجدداً انجام شد.

تکثیر قطعات در مرحله واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز

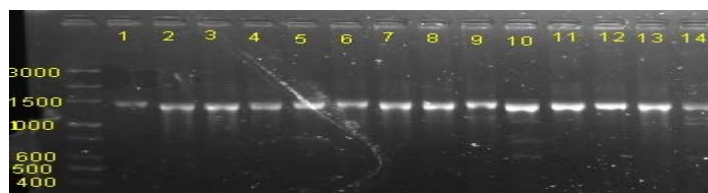
تصویر حاصل از قطعه اولیه تکثیر شده (۱۴۰۰-۱۵۰۰ جفت باز) توسط آغازگرهای پیشرو L-pro و آغازگر پسرو H-phe بر روی ژل آگاروز مطابق شکل (۳) است. تصویر حاصل از قطعه ثانویه تکثیر شده (۶۰۰ جفت باز) توسط آغازگر L-pro و آغازگر H-576 بر روی ژل آگاروز مطابق شکل (۴) است.

با توجه به اینکه ژنوم میتوکندری در اکثر موجودات بویژه در کلیه پستانداران بدون هیچ تغییری از طریق مادر منتقل می‌شود، اندازه جمعیت موثری که با استفاده از این نشانگر محاسبه می‌شود، اندازه جمعیت موثر افراد ماده محسوب می‌شود (Bollongino *et al.*, 2012; Frankham., 2005; Wakeley & Sargsyan, 2009). طبق نظریه Maynard Smith نسبت جنسی در پستانداران ممکن است در کوتاه مدت تغییر کند، ولی در بلند مدت ۱:۱ در نظر گرفته می‌شود (Maynard Smith, 1980; Williams, 1979). در این پژوهش نیز نسبت جنسی ۱:۱ در نظر گرفته شد (Mech & Boitani, 2003) و اندازه جمعیت موثر کل (N_e) دو برابر اندازه جمعیت موثر افراد ماده (N_{ef}) در نظر گرفته شد. همچنین با توجه به اینکه اندازه جمعیت موثر به اندازه جمعیت کل (N_e/N) که بین یک درصد تا ۰/۲۵ درصد در نظر گرفته می‌شود، (Nunney & Elam, 1997; Frankham, 2005) در این مطالعه با معکوس کردن این نسبت اندازه جمعیت کل محاسبه گردید.



شکل ۲- تصویر مربوط به بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده بر روی ژل آگاروز.

Figure2- Image for extracted DNA quality on agaroz gel.



شکل ۳- تصویر قطعه تکثیر شده توسط آغازگرهای پیشرو L-pro و آغازگر پسرو H-phe بر روی ژل آگاروز.

Figure 3- Image for produced piece by primers L-pro and H-phe on agaroz gel.



شکل ۴- قطعه تکثیر شده توسط آغازگرهای پیشرو L-pro و آغازگر پسرو H-576 بر روی ژل آگاروز.

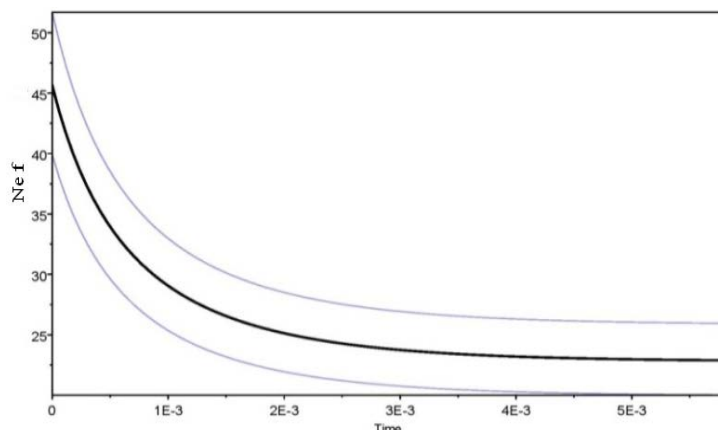
Figure 4- Image for produced piece by primers L-pro and H-576 on agaroz gel.

تجزیه و تحلیل نتایج

نتایج حاصل از نرم افزار بیست با حدود اطمینان ۹۵ درصد بین ۴۰ تا ۵۰ قلاده و به طور متوسط ۴۵ قلاده در نظر گرفته شد. با توجه به وجود نسبت جنسی یک به یک در گرگ‌ها، اندازه جمعیت موثر کل تعداد ۹۰ قلاده تخمین زده می شود. همچنین تعداد کل جمعیت بین ۹۰ تا ۳۶۰ قلاده پیشنهاد می شود. شکل ۵ اندازه جمعیت موثر برآورد شده را در طی زمان نشان می دهد. شکل ۶ نیز مربوط به اجرای برنامه محاسبه اندازه

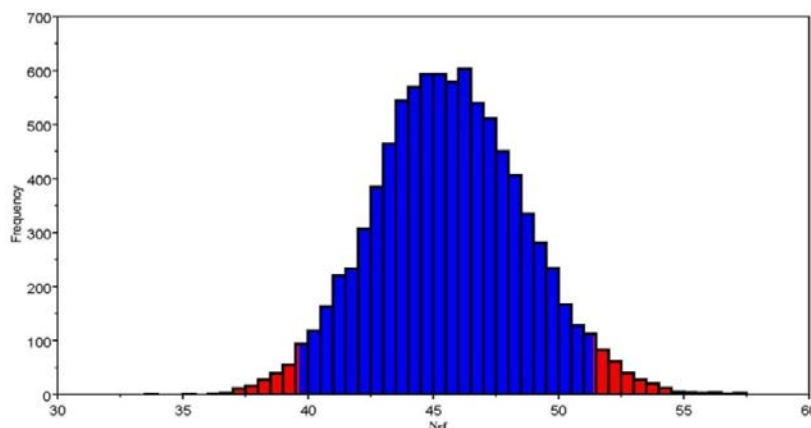
براساس نتایج حاصل از نرم افزار آرلکوین پنج هاپلوتیپ گرگ در استان همدان، سه هاپلوتیپ در استان زنجان و دو هاپلوتیپ در استان قزوین شناسایی شد. میزان تنوع هاپلوئیدی 0.892 ($Hd = 0.892$) و میزان تنوع نوکلئوتیدی 0.079 ($\pi = 0.079$) محاسبه شد، همچنین تعداد جایگاه‌های پلی مورف ۱۹ ($S=19$) جایگاه برآورد شد. اندازه جمعیت موثر افراد ماده (N_{ef}) براساس

جمعیت موثر و تعداد تکرار زنجیره مارکوف در نرم افزار تریسر می باشد.



شکل ۵- برآورد اندازه جمعیت موثر گرگ های ماده.

Figure 5- Calculate the effective population size (N_e) of female wolfe.



شکل ۶- محاسبه اندازه جمعیت موثر بنا بر تعداد تکرار زنجیره مارکوف در نرم افزار تریسر.

Figure 6- Calculate the effective population size (N_e) based on number of repeat Markov chain in Tracer.

بحث و نتیجه گیری

شد و با توجه به نسبت جنسی ۱:۱ اندازه جمعیت موثر نرها نیز ۴۵ قلاده در نظر گرفته شد و تعداد کل جمعیت بین ۹۰ تا ۳۶۰ قلاده برآورد شد. بنابر نظریه Frankham که حداقل اندازه جمعیت موثر مورد نیاز برای بقای جمعیت های وحشی را ۵۰ فرد در نظر می گیرد (Frankham, 1995)، اندازه جمعیت موثر افراد ماده که در این مطالعه محاسبه شد نشان می دهد

بر اساس نتایج حاصل از تعداد هاپلوטיפ های تشکیل شده و میزان تنوع هاپلوئیدی، گرگ های مورد بررسی در این پژوهش از تنوع بالایی برخوردار بودند. در محدوده استان های همدان، قزوین و زنجان با وسعت تقریبی ۵۶۷۰۸ کیلومتر مربع، اندازه جمعیت موثر افراد ماده حدود ۴۵ قلاده محاسبه

جمعیت‌های گرگ نسبت به اندازه جمعیت سرشماری کمتر است (Frankham, 1995; Nunney, 1995; Aspi et al., 2006). با توجه به وجود مهاجرت، قابلیت بالای پراکنش و پراکندگی گرگ و همینطور گستردگی قلمروی این حیوان (Mech & Biotani, 2004)، این میزان اندازه جمعیت موثر همواره با استان‌های همجوار از جمله کردستان و لرستان در ارتباط می‌باشد. به عبارت دیگر به علت جابجایی گله‌های گرگ در طی فصول مختلف سال، می‌تواند اندازه جمعیت موثر گرگ‌ها را در محدوده مناطق ذکر شده دستخوس تغییر کند.

اندازه جمعیت‌های وحشی تحت تاثیر فاکتورهای متفاوتی قرار دارد. نوسانات در اندازه جمعیت یکی از مهمترین فاکتورهای تاثیر گذار بر اندازه جمعیت موثر است و به طور متوسط باعث کاهش ۶۵ درصدی اندازه جمعیت موثر می‌شود (Frankham, 2000). این امر خود بر تغییر ساختار سنی و جنسی جمعیت‌ها اثر گذار بوده و بقاء بلند مدت جمعیت را با خطر روبرو سازد. در طی مطالعه ساختار ژنتیکی گرگ‌ها در منطقه وسیعی از شمال غرب روسیه با بررسی ۱۱ جایگاه ریزماهوراه در ۴۳ نمونه گرگ و با استفاده از آزمون بیسین، اندازه جمعیت موثر بین ۲۸ تا ۸۰ فرد برآورد شد و با استفاده از بکارگیری را بطن نامتعادلی لینکاژ^۱ بین ۳۸ تا ۱۱۵ فرد برآورد شد (Aspi et al., 2009).

که جمعیت گرگ در مناطق ذکر شده از وضعیت نسبتاً مناسبی برخوردار است.

مطالعه مشابهی با استفاده از ۱۵ نمونه فسیل و ۲۶ نمونه از گاوهای اهلی امروزی در خصوص گاوهای منطقه خاورمیانه صورت گرفت. در این مطالعه با استفاده از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری و بکارگیری نظریه یکپارچگی، اندازه جمعیت موثر افراد ماده در زمان اهلی‌سازی گاوها حدود ۸۰ فرد تخمین زده شد (Bollongino et al., 2012). در سال ۲۰۰۹ نیز مطالعه گسترده‌ای با استفاده از ژنوم میتوکندری در ۱۷۱۲ گونه جانوری از رده‌های مختلف (بی‌مهره‌ها، پرندگان، حشرات، خزندگان، ماهی‌ها و پستانداران) صورت گرفت (Piganeau & Eyre, 2012). در این مطالعه با بکارگیری نظریه یکپارچگی و با استفاده از چندین مدل جهش متفاوت اندازه جمعیت موثر افراد ماده مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین در این مطالعه اندازه جمعیت موثر افراد ماده در ۲۶ گونه سگ‌سان و گربه‌سان بررسی شد، که این میزان برای هر یک از گونه‌ها حدود ۱۶ فرد محاسبه شد (از هر گونه به طور متوسط ۲ تا ۴ فرد مورد بررسی قرار گرفتند). نتیجه پژوهش مذکور نشان داد که نوسانات اندازه جمعیت موثری که با استفاده از ژنوم میتوکندری در پستانداران محاسبه می‌شود، نسبت به سایر جانوران کمتر است (Piganeau & Eyre, 2012).

به علت تغییر در تعداد افراد گروه و همپوشانی نسل‌ها همواره اندازه جمعیت موثر

¹Linkage disequilibrium

می‌گردد جهت تخمین اندازه جمعیت کل و اندازه جمعیت موثر در این گونه‌ها، مطالعات آتی در سطحی گسترده‌تر و با استفاده از تعداد بیشتری نمونه صورت گیرند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری کلیه محیط‌بانان و کارشناسان محترم اداره کل حفاظت محیط زیست استان همدان که در مراحل نمونه‌برداری این تحقیق همکاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌شود. این تحقیق با حمایت مالی اداره کل حفاظت محیط زیست استان همدان در چارچوب طرح کاربردی آن اداره کل به انجام رسیده است.

با توجه به تخریب زیستگاه‌های طبیعی و کاهش جمعیت گونه‌های جنس *Canis* در اکثر نقاط کشور ممکن است در آینده نزدیک جمعیت این گونه‌ها کاهش یابد بویژه در استان‌های غربی که در سال‌های اخیر حملات گرگ به دام‌های اهلی و انسان افزایش یافته و این امر باعث کشتار این حیوان توسط مردم بومی شده است. بنابراین برنامه پایش منظم ژنتیکی امری لازم به شمار می‌رود. متأسفانه یکی از مشکلاتی که در طی انجام این پژوهش وجود داشت کمبود تعداد نمونه بود، لذا با توجه به حساسیت مطالعات ژنتیکی نسبت به تعداد نمونه و قدرت بالای پراکندگی گونه گرگ و سایر گوشتخواران بزرگ جثه پیشنهاد

منابع

- Ardalan A, Kluetsch C, Zhang A, Erdogan M, Uhlen M, Houshmand M, M. Tepeli, C, Ashtiani, S. R., & Savolainen P (2011). Comprehensive study of mtDNA among Southwest Asian dogs contradicts independent domestication of wolf, but implies dog-wolf hybridization. *Ecology and Evolution* 1: 373-385.
- AsadiAghbolaghi M^a, Kaboli M, Rezaei HR, Shabani A, Zamani W (2014). Variations of mitochondrial control region in Iranian wolves and dogs populations. *Agricultural Biotechnology* 6: 16-26 (In Persian).
- AsadiAghbolaghi M^b, Rezaei HR, Scandura M, Kaboli M (2014). Low geneflow between Iranian Grey Wolves (*Canis lupus*) and dogs documented using uniparental genetic markers. *Zoology Middle East* 60: 95-106.
- Aspi J, Roininen E, Ruokonen M, Kojola I, Vila C (2006). Genetic diversity, population structure, -effective populationsize and demographic history of the Finnish wolf population. *Molecular Ecology* 15: 1561-1576.
- Aspi J, Roininen E, Kiiskila J, Ruokonen M, Kojola I, Bljudnik E et al (2009). Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. *Conservation Genetics* 10: 815-826.
- Atkinson Q, Gray R, Drummond A (2008). MtDNA Variation Predicts Population Size in Humans and Reveals a Major Southern Asian Chapter in Human Prehistory. *Molecular Biology* 25:468-474.
- Bollongino R, Burger J, Powell A, Mashkour M, Vigne J, Thomas M (2012). Modern Taurine Cattle Descended from Small Number of Near-Eastern Founders. *Molecular Biology and Evolution* 10: 1093-1097.
- Douzery E, Randi E (1997). The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology* 14: 1154-1166.

- Drummond AJ, Ho S Y W, Rawlence N, Rambaut A (2007). A Rough Guide to BEAST 1.4. PP:41.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus O (2005). Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 22:1185–1192.
- Frankham R (1995). Effective population-size adult-population size ratios in wildlife — a review. *Genetical Research* 66: 95–107.
- Frankham R (2005). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. New York. pp. 640.
- Freeland J (2005). *Molecular Ecology*. Open University, Milton Keynes press. pp: 402.
- Hare M, Nunney L, Schwartz M, Ruzzante D, Burford M, Waples R (2011). Understanding and Estimating Effective Population Size for Practical Application in Marine Species Management. *Conservation Biology* 25: 438–449.
- Kalinowski S, Waples R (2002). Relationship of effective to census size in fluctuating populations. *Conservation biology* 16: 129-136.
- Kharrati koopaei H, Mohammadabadi MR (2013). Model for prediction of fat and milk production traits using of DGAT1 gene polymorphism in Iranian Holstein cattle population. *Agricultural Biotechnology* 5: 17-28 (In Persian).
- Krebs CJ (1999). *Ecological Methodology*. University of British Columbia, Vancouver. Canada. pp; 624.
- Mech LD, Boitani L (2003). Wolf social ecology. In: *wolves behavior, ecology and conservation*. University of Chicago press, Chicago. Illinois. pp; 472.
- Maynard Smith J (1980) A new theory of sexual investment. *Behavioral Ecology. Socio biology* 7: 247-251.
- Naderi S, Rezaei HR, Pompanon F, Blum M, Negrini R, Naghash H et al (2008). The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 17659–17664.
- Nunney L (1995). Measuring the ratio of effective population size to adult numbers using genetic and ecological data. *Evolution* 49: 389–392.
- Nunney L, Elam DR (1994). Estimating the effective population size of conserved populations. *Conservation biology* 8: 175–185.
- Peng M, Zhang Y (2011). Inferring the Population Expansions in Peopling of Japan. *PLoS ONE* 6. 6. e21509.
- Piganeau G, Eyre-Walker A (2009). Evidence for Variation in the Effective Population Size of Animal Mitochondrial DNA. *PLoS one* 4 : 2 . e4396.
- Randi E, Lucchini V, Christensen MF, Mucci N, Funk SM, Dolf G et al (2000). Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology* 14: 404-47.
- Russell A, Goodaman S, Fiorentino I, Yodera (2008). Population Genetic Analysis of Myzopoda (Chiroptera: Myzopodidae) in Madagascar. *Journal of Mammalogy* 89: 209–221.
- Solberg K, Bellemain E, Drageset O, Taberlet P, Swenson J (2006). An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Conservation Biology* 128: 158 –168.
- Tallmon D, Bellemaine E, Swenson J, Taberlet P (2004). Genetic monitorin of Scandinavian Brown Bear effective population size and immigration. *Wild life managment* 68:960–965.

- Wesley M, Hochachka KM, Doyle F, Krebs CJ (2000). Monitoring vertebrate populations using observational data. *Conservation Zoology* 78: 521–529.
- Wakeley J, Sargsyan O (2009). Extensions of the Coalescent Effective Population Size. *Genetics* 181: 341–345.
- Williams GC (1979). The question of adaptive sex ratio in outcrossed vertebrates. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 205: 567-580.
- Zhang SM, Wang DQ, Zhang YP (2003). Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Conservation Genetics* 4: 673–683.
- Ziaei H (2009). A Field Guide to the Mammals of Iran. Tehran: Iran Wildlife Center pp.100 (In Persian).
- Zamani W , Rezaei HR, Bazyan S, Aghili M, Shabani A , AsadiAghbolaghi M, Zamani N (2015). Approach of molecular technique to identify Artiodactyls based on mitochondrial D-loop polymorphism. *Agricultural Biotechnology* 6: 64-74 (In Persian).

Calculation of the effective population size and estimating of total population size using mitochondrial DNA sequencing in Hamedan, Qazvin and Zanjan provinces

AsadiAghbolaghi M.¹, Kaboli M.^{*2}, Rezaei H.R.³, Behdarvand N.⁴, Khosravi R.⁵

¹ PhD student of environment, University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran.

² Associate Professor, Department of Environment Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

³ Associate Professor, Department of Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

⁴ PhD Student of environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

⁵ PhD student of environment, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Iran.

Abstract

Although wolves have the ability to live in different habitat types, in recent years their population has been drastically reduced in most parts of the country and in some areas has become extinct. Conservation programs are essential to ensure the viability of the remaining wolf populations. Wildlife management programs are depended on estimation of population size. With the development of molecular ecology in recent years and considering the ineffectiveness of traditional methods to estimate population size, population genetics methods have been developed to estimate population size more accurately than traditional methods. The mitochondrial genome is a strong indicator in predicting changes of population size of wild animals and calculating the effective population size (N_e) of female animals. Using mtDNA markers, we calculated the female effective population size in Hamedan, Qazvin, and Zanjan provinces. According to sex ratio (1:1) and ratio of effective population size to the census population size (N_e/N), the total population size was calculated between 90 to 360 wolves in these provinces. Our results suggest that estimating the effective population size by molecular markers is a useful tool for management of small and isolated populations.

Keywords: *Wolf, mtDNA, effective population size, population size, Hamedan, Qazvin, Zanjan.*

* Corresponding Author: Kaboli M.

Tel: 02632223044

Email: mkaboli@ut.ac.ir