Archive of SID



# کاربرد نمونه‌برداری غیرتهاجمی سرگین برای شناسایی ژنتیکی گوشت‌خواران (پژوهش موردی: شمال‌غرب ایران)

• **احسان محمدی‌مقانکی***: انجمن یوزپلنگ ایرانی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۸۵۴۹-۱۴۱۵۵

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۶

## چکیده

**پایش جمعیت گونه‌های کمیاب یا پنهان‌کار مانند گوشت‌خواران، به نمونه‌برداری از افراد جمعیت نیاز دارد که فرآیندی دشوار، هزینه‌بر و با نگرانی از اثر منفی بر جانور است. یکی از روش‌های پرکاربرد و غیرآسیب‌رسان گردآوری اطلاعات، تحلیل ژنتیکی نمایه‌های زیستی به‌جامانده از جانوران در زیستگاه طبیعی آنان است. برای ارزیابی کارایی این روش غیرتهاجمی در شناسایی گوشت‌خواران ایران، ٦ منطقه حفاظت‌شده در شمال‌غرب ایران برای نمونه‌برداری سرگین با هدف استخراج DNA پیمایش شدند. هم‌چنین، درستی شناسایی میدانی سرگین هر گونه براساس ویژگی‌های ظاهری مورد ارزیابی قرار گرفت. از مجموع ۱۷٤ سرگین گردآوری‌شده با پیمایش فرصت‌طلبانه حدود ۲۹۰ کیلومتر، ٦۷/۲ درصد نمونه‌ها (۱۱۷ نمونه) با موفقیت برای توالی مورد نظر سیتوکروم b، تکثیر و تا سطح گونه شناسایی شدند. سرگین‌های شناسایی‌شده به‌روش ژنتیکی مربوط به ٦ گونه گوشت‌خوار شامل خرس قهوه‌ای (*Ursus arctos*)، گربه وحشی (*Felis silvestris/lybica*)، گرگ (*Canis lupus*)، روباه معمولی (*Vulpes vulpes*)، سمور سنگی (*Martes foina*) و شنگ (*Lutra lutra*) بودند. بدون درنظرگرفتن اثر تعداد نمونه، کم‌ترین نرخ شناسایی درست سرگین در طبیعت (نرخ مثبت صحیح) مربوط به گربه وحشی و شنگ و بیش‌ترین مربوط به خرس قهوه‌ای بود. بیش‌ترین نرخ اشتباه در شناسایی سرگین در طبیعت (نرخ مثبت کاذب) به سمور سنگی تعلق داشت. در مقابل، بیش‌ترین نرخ رد اشتباه یک سرگین (نرخ منفی کاذب) مربوط به گربه وحشی و روباه معمولی بود. این پژوهش، پایه‌ای را برای پژوهش‌های بیش‌تر با هدف گردآوری اطلاعات علمی مورد نیاز برنامه‌های حفاظت از حیات وحش ایران به کمک ابزارهای مولکولی فراهم می‌سازد.**

**کلمات کلیدی:** نمونه‌برداری غیرتهاجمی، نمایه زیستی، DNA سرگین، تکثیر موفق، شناسایی گونه، گوشت‌خواران



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ehsan.moqanaki@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID



## مقدمه

پایش جمعیت‌های حیات‌وحش در دو دهه گذشته شاهد معرفی طیف گسترده‌ای از روش‌های نوین در گردآوری و تحلیل داده‌ها بوده است. بیش‌تر روش‌های سنتی گردآوری داده از افراد یک جمعیت جانوری، آسیب‌رسان یا تهاجمی (Invasive) هستند. زیرا در فرآیند نمونه‌برداری، به زنده‌گیری، مقیدساختن یا به‌طورکلی کار مستقیم با جانور هدف نیاز است (Kelly و همکاران، ۲۰۱۲). دشواری اجرا، نیاز به مهارت بالا و هزینه‌بر بودن روش‌های تهاجمی، در کنار نگرانی از کار مستقیم با گونه‌های در خطر انقراض یا گونه‌هایی مانند گوشت‌خواران که ممکن است به‌دلیل اندازه یا رفتار خود برای پژوهشگر نیز دارای خطر باشند، سبب شده‌است تا این رویکرد در گستره‌های جغرافیایی پهناور چندان عملی نباشد (Farrell و همکاران، ۲۰۰۰؛ Fernandes و همکاران، ۲۰۰۸؛ Harrington و همکاران، ۲۰۱۰). مجموع ضعف‌های اشاره‌شده و کاهش روزافزون گستره پراکنش و اندازه جمعیت‌های حیات وحش، حفاظت گرایان را به جست‌وجوی فعالانه برای ابزارهای غیرتهاجمی، پیشرفته و کارآمد ناگزیر ساخته‌است. رایج‌ترین روش‌های نمونه‌برداری غیرتهاجمی شامل پیمایش نمایه‌ها (رد پا، سرگین، مو و بقایای شکار)، تحلیل ژنتیکی نمایه‌های زیستی، استفاده از دوربین‌های تله‌ای و نمونه‌برداری هورمونی هستند (Kelly و همکاران، ۲۰۱۲). مبنای کلی همه این روش‌ها آن است که جانور هدف، در زمان گردآوری داده در آن محل حضور ندارد و در نتیجه فرض بر آن است که فرآیند گردآوری اطلاعات بدون آسیب یا کم‌ترین اثر منفی بر جانور است (Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹). پیش‌نیاز استفاده از داده‌های غیرتهاجمی در پژوهش‌های حیات وحش، شناسایی درست گونه‌ای است که آثار به‌جامانده به آن تعلق دارد (Chaves و همکاران، ۲۰۱۲؛ Monterroso و همکاران، ۲۰۱۳). شناسایی حضور گونه‌های حیات‌وحش با استفاده از آثار به‌جامانده از آنان در طبیعت به‌صورت سنتی براساس ویژگی‌های ظاهری نمایه (Chame، ۲۰۰۳) و مواد هضم‌نشده موجود در آن (در مورد سرگین) صورت می‌گیرد که هیچ‌یک ثابت و قابل تکیه نیستند (Anwar و همکاران، ۲۰۱۱؛ Morin و همکاران، ۲۰۱۶). حتی پژوهشگران میدانی باتجربه نیز خطای درخور توجهی در شناسایی گونه مربوط به نمایه‌ها دارند (Davidson و همکاران، ۲۰۰۲؛ Harrington و همکاران، ۲۰۱۰). این شناسایی زمانی دشوارتر خواهد شد که چندین گونه هم‌بوم با اندازه بدن، رژیم غذایی و نمایه‌های مشابه در یک زیستگاه حضور داشته و گونه هدف نیز کمیاب یا پنهان‌کار باشد (Reed و همکاران، ۲۰۰۴؛ Michalski و همکاران، ۲۰۱۱؛ Chaves و همکاران، ۲۰۱۲). شناسایی اشتباه این نمایه‌ها ممکن است نتایج چنین پژوهش‌هایی را دچار انحراف کند (Harrington و همکاران، ۲۰۱۰؛ Martínez-Gutiérrez و همکاران، ۲۰۱۵). نمونه‌برداری ژنتیکی غیرتهاجمی (Non-invasive geneticsampling) یا نمونه‌برداری غیرتهاجمی DNA، یکی از روش‌هایی است که در دو دهه گذشته در طیف گسترده‌ای از پژوهش‌های حیات وحش از شناسایی حضور یک گونه در زیستگاه تا تحلیل‌های پیچیده فراجمعیتی در پهنه‌های گسترده جغرافیایی به‌کار رفته‌است (Beja Pereira و همکاران، ۲۰۰۹؛ Kelly و همکاران، ۲۰۱۲). به‌طورکلی، این روش بر پایه استخراج DNA گونه هدف از نمایه‌های زیستی باقی‌مانده از جانور در طبیعت مانند سرگین (مدفوع)، مو، ادرار و بزاق آن صورت می‌گیرد (Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹؛ Nowak و همکاران، ۲۰۱۴). در پژوهش گونه‌های کمیاب یا پنهان‌کار حیات‌وحش مانند پستانداران گوشت‌خوار، سرگین این جانوران بارزترین نمایه زیستی است که بدون آسیب به جانور یا زیستگاه آن و معمولاً به‌سادگی و در مقادیر زیاد قابل گردآوری است (Farrell و همکاران، ۲۰۰۰؛ Fernandes و همکاران، ۲۰۰۸). در هر بار دفع یک جانور، بخشی از سلول‌های بافت پوششی روده آن نیز به‌صورت طبیعی همراه سرگین دفع می‌شوند. با استخراج DNA از این سلول‌های موجود در سرگین به کمک روش‌های آزمایشگاهی، امکان تکثیر توالی یا قطعه مشخصی از DNA میتوکندری یا هسته برای شناسایی گونه و DNA هسته برای شناسایی افراد و جنسیت آن‌ها به کمک نشانگرهای تخصصی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز وجود خواهد داشت (Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹؛ Chaves و همکاران، ۲۰۱۲).

نمونه‌برداری غیرتهاجمی DNA دارای محدودیت‌هایی است که اگر به‌خوبی شناخته و مدیریت نشوند، کاربرد آن را برای برنامه‌های بلندمدت پایش گونه‌های حیات وحش محدود می‌سازند. محدودیت اصلی این روش در آن است که DNA گونه هدف در نمایه‌های زیستی، به‌میزان بسیار کم و با کیفیت پایین وجود دارد که در کنار حضور DNA غیرهدف و مختل‌کنندگان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR inhibitors)، همگی به کاهش تکثیر موفق DNA هدف و احتمال بالای خطا در شناسایی ژنوتیپ منجر خواهند شد (Fernandes و همکاران، ۲۰۰۸؛ Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹) این عوامل با در نظرگرفتن ویژگی‌های یک پژوهش و هم‌چنین تنوع زیستگاهی در مناطق مورد مطالعه می‌توانند اثرگذاری متفاوتی بر نتایج داشته‌باشند (Michalski و همکاران، ۲۰۱۱؛ Monterroso و همکاران، ۲۰۱۳). در نتیجه، راهنمای واحدی برای اجرای بهینه این روش وجود ندارد تا بتوان بدون درنظرگرفتن شرایط گونه هدف یا منطقه مورد مطالعه، از آن در همه پژوهش‌ها برای برآورد تعداد نمونه‌ها و بودجه مورد نیاز استفاده کرد. از این‌رو، اجرای یک پژوهش مقدماتی بر جمعیت حیات وحش هدف در شرایط طبیعی زیستگاه آن، پیش‌نیاز طراحی و اجرای برنامه‌های پایش مبتنی بر نمونه‌برداری غیرتهاجمی DNA



www.SID.ir

Archive of SID



است(Beja-Pereiraوهمکاران،۲۰۰۹؛Lonsingerو همکاران، ۲۰۱۵). تاکنون بهره‌گیری از نمونه‌برداری غیرتهاجمی DNA به پژوهش‌های تبارشناسی جغرافیایی (Phylogeography) یا بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های حیات وحش ایران به‌ویژه علف‌خواران محدود مانده‌است (مانند Naderi و همکاران، ۲۰۰۸؛ نصیری‌مقدم و همکاران، ۱۳۹۳؛ اشرف‌زاده، ۱۳۹۴؛ Khosravi و همکاران، ۲۰۱۷). پژوهش حاضر با هدف سنجش کارایی روش نمونه‌برداری غیرتهاجمی DNA سرگین، به‌عنوان ابزاری برای پایش جمعیت‌های گوشت‌خواران ایران انجام گرفت. ابتدا گونه‌های مربوط به سرگین‌های گردآوری‌شده از طبیعت به‌صورت ژنتیکی شناسایی شدند. سپس، درستی روش سنتی شناسایی میدانی سرگین برای هرگونه گوشت‌خوار ارزیابی شد. در پایان، استفاده کارآمد از این روش در شرایط زیستگاه‌های ایران مورد بحث قرار گرفت و پیشنهادهایی برای پژوهش‌های آتی ارائه شد.

## مواد و روش‌ها

**مناطق‌مورد مطالعه:** پژوهش پیش‌رو در ۶ منطقه حفاظت‌شده در شمال‌غرب ایران انجام پذیرفت (شکل ۱). این مناطق از نظر اقلیم، شرایط زیستگاهی، تنوع زیستی، پیشینه حفاظت، جامعه مردم ساکن و فشار توسعه ناپایدار متفاوت بوده و بخشی از آنان دارای اولویت پژوهشی و حفاظتی برای گوشت‌خواران در سراسر زیست‌بوم قفقاز به‌شمار می‌روند (Moqanaki و همکاران، ۲۰۱۳).

۱. منطقه حفاظت‌شده مراکان، آذربایجان‌غربی (′۴۱ ′۳۸ °۴۶ تا ′۸ ′۳۹ °۴۶ عرض شمالی و ′۳۷-′۵ °۴۵ طول شرقی): با وسعت حدود ۱۰۵۰ کیلومتر مربع، در شهرستان خوی و امتداد مرز با نخجوان قرار دارد. اقلیم مراکان، نیمه‌خشک معتدل با میانگین دما و بارش سالیانه به ترتیب ۱۲ درجه‌سلسیوس و ۲۸۰ میلی‌متر است (درویش‌صفت، ۱۳۸۵). ناهمواری‌های عمده آن کوهستانی و تپه‌ماهوری با دامنه ارتفاعی ۷۲۰ تا ۲۱۰۰ متر و آبراهه‌های گوناگون انشعاب‌یافته از رودخانه‌های ارس و آق‌چای است.

۲. پارک ملی کنتال، آذربایجان‌شرقی (′۵۳-′۴۶ °۳۸ عرض شمالی و ′۱۳-′۰ °۴۶ طول شرقی): ۷۰ کیلومتر مربع از منطقه امن پناهگاه حیات وحش کیامکی در شهرستان جلفا است (درویش‌صفت، ۱۳۸۵) که در سال ۱۳۹۰ به پارک ملی ارتقا یافت. ناهمواری‌های بارز این منطقه شامل عرصه‌های کوهستانی مرتفع با آبراهه‌های متعدد است که به یک دره اصلی در امتداد رود ارس در مرز با نخجوان و ارمنستان منتهی می‌شوند.میانگین بارش و دمای سالیانه به‌ترتیب ۲۸۳ میلی‌متر و ۱۴ درجه سلسیوس است.

۳. ذخیره‌گاه زیست‌سپهر ارسباران، آذربایجان‌شرقی (′۴۲ ′۳۸ °۴۶ تا ′۸ ′۳۹ °۴۶ عرض شمالی و ′۵۹-′۴۲ °۴۶ طول شرقی): عرصه حفاظت شده‌ای به‌وسعت تقریبی ۸۰۰ کیلومترمربع در حاشیه جنوبی رودخانه ارس در شهرستان کلیبر است. با دامنه ارتفاعی ۲۵۶ تا ۲۸۴۰ متر، میانگین بارش سالیانه ۲۷۵ میلی‌متر و میانگین دمای سالیانه ۱۰ درجه سلسیوس، ارسباران منطقه‌ای کوهستانی است که با اقلیم نیمه مرطوب معتدل شناخته می‌شود (درویش‌صفت، ۱۳۸۵).

۴. منطقه حفاظت‌شده آق‌داغ، اردبیل (′۳۵-′۴ °۳۷ عرض شمالی و ′۳۵-′۲۰ °۴۸ طول شرقی):با ۹۴۰ کیلومتر مربع وسعت در شهرستان خلخال، آق‌داغ دارای ناهمواری‌های عمده کوهستانی و تپه ماهوری با دامنه‌ارتفاعی ۵۰۰ تا ۱۶۸۰ متر است. اقلیم مدیترانه‌ای معتدل منطقه در نتیجه میانگین بارش و دمای سالیانه به‌ترتیب ۵۰۰ میلی‌متر و ۱۳ درجه سلسیوس است (درویش‌صفت، ۱۳۸۵).

۵. منطقه حفاظت‌شده لیسار، گیلان (′۵۲ °۳۷ تا ′۲ °۳۸ عرض شمالی و ′۵۶-′۳۲ °۴۸ طول شرقی): ۳۱۰ کیلومتر مربع از پهنه‌ای جنگلی مرتفع تا جلگه‌ای در شهرستان تالش است. دامنه ارتفاعی از ۳۰- متر در تالاب جوگندان در شرق تا حدود ۲۶۰۰ متر در دریاچه نئور در غرب متغیر است. اقلیم، میانگین بارش و دمای سالیانه آن نیز به‌ترتیب مدیترانه‌ای تا خیلی مرطوب معتدل، ۶۰۰ تا ۱۱۰۰ میلی‌متر و ۳ تا ۱۶درجه سلسیوس متغیر است (درویش‌صفت، ۱۳۸۵).

۶. پناهگاه حیات وحش انگوران، زنجان (′۳۶-′۳۰ °۳۶ عرض شمالی و ′۵۰-′۳۴ °۴۷ طول شرقی): این منطقه ۲۹۸ کیلومتر مربعی در شمال‌رشته‌کوه‌زاگرس‌در شهرستان ماه‌نشان قرار دارد و ناهمواری‌های غالب آن در برگیرنده ارتفاعات کوهستانی و تپه‌ماهوری با دامنه ارتفاعی ۱۲۸۰ تا ۲۲۰۰ متر است. انگوران دارای اقلیم نیمه‌خشک معتدل همراه با میانگین بارندگی و دمای سالیانه به‌ترتیب ۴۰۰ میلی‌متر و ۱۰ درجه سلسیوس است (درویش‌صفت، ۱۳۸۵).

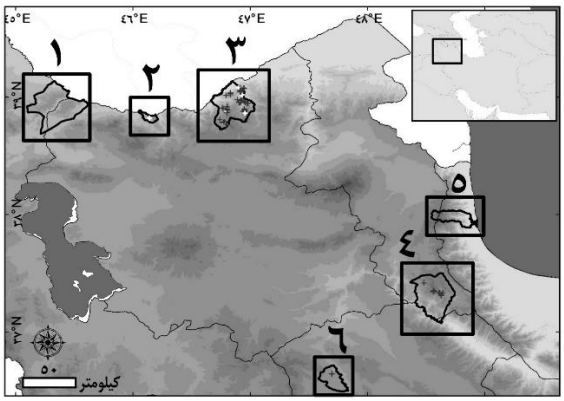
**نمونه‌برداری سرگین:** نمونه‌برداری سرگین گوشت‌خواران در مناطق مورد مطالعه در فاصله ۳۰ خرداد تا ۱۰ مهر ۱۳۹۱ انجام پذیرفت. پیش از شروع پیمایش میدانی، مهم‌ترین زیستگاه‌های حیات وحش در هر منطقه و مناطقی که بیش‌ترین گزارش‌های مشاهده گوشت‌خواران بزرگ از آن‌ها وجود داشت در گفت‌وگو با محیط‌بانان شناسایی شدند. برای افزایش احتمال یافتن سرگین گوشت‌خواران، پیمایش‌های میدانی بر مسیرهای طبیعی حیات وحش یا جاده‌های خاکی کم‌تردد موجود در هر منطقه متمرکز بود که گوشت‌خواران بزرگ و متوسط برای رفت‌وآمد در زیستگاه از این مسیرها بیش‌تر استفاده می‌کنند (Monterroso و همکاران، ۲۰۱۳). در طول این مسیرها،نمونه‌برداری به‌صورت فرصت‌طلبانه انجام شد(Reedو همکاران، ۲۰۰۴).



www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۱: موقعیت ۶ منطقه مورد مطالعه در شمال‌غرب ایران: (۱) منطقه حفاظت‌شده مراکان، (۲) پارک ملی کنتال، (۳) ذخیره‌گاه زیست‌سپهر ارسباران، (۴) منطقه حفاظت‌شده آق‌داغ، (۵) منطقه حفاظت‌شده لیسار و (۶) پناهگاه حیات‌وحش انگوران. سرگین‌هایی که به‌روش ژنتیکی تا سطح گونه شناسایی شدند با نشان مثبت سیاه و سایر نمونه‌های ناموفق به رنگ سفید نمایش داده شده‌اند.**

نیروهای میدانی شامل نویسنده، یک همکار میدانی و حداقل یک محیط‌بان، به‌صورت پیاده به جست‌وجوی دقیق این مسیرها پرداختند و برای کاهش احتمال خطا، همه یادداشت‌برداری‌ها و نمونه‌برداری‌ها توسط نویسنده انجام شد. در برخورد با سرگین‌های مشکوک به گوشت‌خواران (Chame، ۲۰۰۳) ابتدا موقعیت هر سرگین به کمک یک دستگاه GPS دستی ثبت شد و یک شماره انحصاری به آن سرگین تعلق گرفت. نیروهای میدانی درباره گونه احتمالی مربوط به هر سرگین براساس ویژگی‌های ظاهری آن (Chame، ۲۰۰۳)، محل دفع و سایر نمایه‌های موجود پیرامون آن مانند رد پا (Reed و همکاران، ۲۰۰۴) توافق کردند. در صورت عدم توافق، گونه نامعلوم درنظر گرفته شد. سپس، هر سرگین با دقت به کمک دو تکه چوب تازه یا دستکش یک‌بارمصرف درون پاکت‌های کاغذی جداگانه دارای شماره انحصاری و سن تقریبی، تاریخ و مکان گردآوری آن سرگین قرار داده شد. نهایت دقت در جلوگیری از آلوده‌شدن سرگین‌ها به یکدیگر به‌کار رفت. سرگین‌های تخریب‌شده یا در حال تجزیه گردآوری نشدند. در پایان هر روز نمونه‌برداری (کم‌تر از ۱۲ ساعت از گردآوری نخستین نمونه آن روز)، به کمک تیغ جراحی استریل‌شده با الکل و شعله حدود یک گرم از سطح بیرونی ماده سرگین هر نمونه با دقت و به‌صورت جداگانه تراشیده شد و به ظرف نگه‌داری آزمایشگاهی ۱۰ میلی‌لیتری دارای اتانول ۹۵٪ (حداقل نسبت ۱ به ۴) با شماره انحصاری منتقل شدند (Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹). نمونه‌های درون اتانول به‌مدت حداکثر چهار ماه از زمان گردآوری نخستین نمونه، در دمای اتاق و شرایط خشک و تاریک نگه‌داری شدند و سپس به فریزر آزمایشگاهی با دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

**استخراج DNA:** فرآیند استخراج DNA در اتاقی مجزا از آزمایشگاه اصلی که برای نمونه‌های کیفیت پایین تعبیه شده بود انجام پذیرفت. استخراج به کمک کیت تجاری QIAamp™ DNA Stool Mini Kit (شرکت سازنده .Qiagen Inc) و براساس راهنمای سازنده با تغییرات جزئی در برخی مراحل انجام شد (جزئیات در Moqanaki و همکاران، ۲۰۱۳). یک نمونه بدون DNA (نمونه منفی) در هر نوبت استخراج (بین ۱۱ تا ۱۵ نمونه) لحاظ شد تا در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، احتمال آلوده‌شدن نمونه‌ها به یکدیگر یا DNA غیرهدف در مرحله استخراج رصد شود (Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹).

**طراحی آغازگرهای سیتوکروم b:** چند توالی کامل سیتوکروم b برای هریک از گوشت‌خواران مورد انتظار براساس درویش‌صفت (۱۳۸۵) از بانک ژن استخراج شد و برای شناسایی یک قطعه کوتاه چندشکلی محافظت‌شده متفاوت بین گونه‌ها، به کمک نرم‌افزار BioEdit (Hall، ۱۹۹۹) ردیف‌یابی و با یکدیگر مقایسه شدند (Farrell وهمکاران، ۲۰۰۰؛ Fernandes و همکاران، ۲۰۰۸). بر این اساس، یک آغازگر پیشرو ’5-CTTTYTCATCAGTCACCCACATYTGC-3 و پسرو ’5-TCAGAAGGACATTTGTCCTCABGGT-3’ برای تکثیر یک جایگاه ۱۸۹ جفت‌باز در ژن سیتوکروم b طراحی شدند. کارایی این آغازگرها پیش از استفاده برای نمونه‌های DNA سرگین، با نمونه‌های معیار شامل DNA بافت خرس قهوه‌ای (*Ursus arctos*)، روباه معمولی (*Vulpes vulpes*)، و گربه وحشی (*Felis silvestris/ lybica*) آزمایش شدند و مورد تایید قرار گرفت.

**تکثیر DNA میتوکندری، توالی‌یابی و شناسایی گونه:** جزئیات فرآیند آزمایشگاهی تکثیر جایگاه ژنی مورد نظر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در Moqanaki و همکاران (۲۰۱۳) ارائه شده‌است. مخلوط در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ تا ۲ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x PCR II، ۲/۵ میکرولیتر از هر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۲/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مولار، یک میکروگرم آلبومین سرم گاوی، یک میکرولیتر از هر آغازگر پسین و پیشین ۱۰میکرومولار، نیم واحد DNA پلی‌مراز AmpliTaq (شرکت سازنده Applied Biosystems) و ۱۳/۴ تا ۱۴/۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر آماده شد. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه، واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۳۵ چرخه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بسط



www.SID.ir

Archive of SID



نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. افزون‌بر یک نمونه منفی، یک نمونه معیار DNA روباه (کنترل مثبت) نیز در هر واکنش قرار داده می‌شد تا شرایط واکنش و احتمال آلوده شدن نمونه‌ها رصد شود (Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹). محصول این واکنش روی ژل آگاروز ۲٪ به‌کمک GelRed™ (شرکت سازنده Biotium Inc.) با الکتروفورز جداسازی شدند و تصاویر مربوط به ژل‌ها به کمک دستگاه مستندساز ژل ثبت شد. نمونه‌هایی که محصولی با اندازه مورد نظر تولید کرده بودند برای مرحله توالی‌یابی آماده شدند (Moqanaki و همکاران، ۲۰۱۳). محصول‌های منفی، براساس روش توصیه‌شده توسط Hebert و همکاران (۲۰۱۱) با Chelex تغلیظ‌یافته ۲۰٪ جوشانده شدند و دوباره در غلظت‌های مختلف DNA به‌صورت جداگانه تا ۵نوبت در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شدند. نمونه‌هایی که پس از این مرحله هم‌چنان محصول موردنظر را تولید نکرده بودند، از مراحل بعدی حذف شدند.

محصول نمونه‌های موفق در تکثیر پس از یک مرحله رسوب دادن، با استفاده از آغازگر پیش‌رو وارد یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شدند تا برای توالی‌یابی آماده شوند (Moqanaki و همکاران، ۲۰۱۳). محصول این واکنش پس از رسوب‌دادن دوباره و سپری‌کردن حداقل ۱۲ساعت در دمای آزمایشگاه برای خشک‌شدن، به‌کمک یک دستگاه ABI Prism®3100(ساخت شرکت Applied Biosystems) توالی‌یابی شد. هم‌آرایی توالی‌ها به‌کمک Clustal W در نرم‌افزار BioEdit (Hall، ۱۹۹۹) انجام گرفت و در صورت نیاز، به‌صورت دستی ویرایش شدند. این توالی‌ها در نهایت با استفاده از جست‌وجوی BLASTn در بانک ژن‌باسایر توالی‌های انتشاریافته از محدوده موردنظر DNAمیتوکندری جانوران مقایسه شدند و در صورت تطبیق بالای ۹۵٪ با یک گونه، به عنوان شناسایی قطعی پذیرفته شدند. نرخ موفقیت تکثیر DNA میتوکندری برابر نسبت نمونه‌هایی بود که محصول مورد نظر را در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تولید کردند و به شناسایی قطعی گونه منتهی شدند.

**مقایسه شناسایی سرگین گونه به کمک روش‌های میدانی و ژنتیکی:** نمونه‌هایی که گونه مربوط به آن‌ها به‌کمک توالی سیتوکروم b شناسایی شدند، برای ارزیابی درستی روش سنتی میدانی (شناسایی احتمالی) در مقایسه با روش ژنتیکی (شناسایی قطعی) استفاده شدند. برای این منظور یک «جدول ارزیابی اشتباه» ایجاد شد (Morin و همکاران، ۲۰۱۶). این جدول بر مبنای بروز چهار حالت ممکن در شناسایی میدانی سرگین‌های هر گونه تنظیم شد: ۱. مثبت صحیح: تعداد نمونه‌هایی که گونه شناسایی‌شده در روش میدانی با روش ژنتیکی تایید شده‌است؛ ۲. مثبت کاذب: تعداد نمونه‌هایی که گونه شناسایی‌شده در روش میدانی با روش ژنتیکی رد شده‌است؛ ۳. منفی کاذب: تعداد نمونه‌هایی که گونه ردشده در روش میدانی با روش ژنتیکی تایید شده‌است و ۴. منفی صحیح: تعداد نمونه‌هایی که گونه ردشده در روش میدانی با روش ژنتیکی نیز رد شده‌است. برهمین اساس، نرخ بروز چهار حالت ممکن در شناسایی میدانی سرگین یک گونه را می‌توان محاسبه کرد (Morin و همکاران، ۲۰۱۶): ۱. نرخ مثبت صحیح: به چه میزان سرگین گونه x به‌درستی در طبیعت شناسایی شده‌است؟ (مثبت صحیح تقسیم بر مجموع مثبت صحیح و منفی کاذب)؛ ۲. نرخ مثبت کاذب: به چه میزان سرگین یک گونه دیگر در طبیعت با سرگین گونه x اشتباه گرفته شده‌است؟ (مثبت کاذب تقسیم بر مجموع منفی صحیح و مثبت کاذب)؛ ۳. نرخ منفی کاذب: به چه میزان با سرگین گونه x در طبیعت برخورد شده ولی به اشتباه رد شده‌است؟ (منفی کاذب تقسیم بر مجموع مثبت صحیح و منفی کاذب)؛ ۴. نرخ منفی صحیح: به چه میزان سرگین‌هایی که متعلق به گونه x نبودند به‌درستی در طبیعت رد شده‌اند؟ (منفی صحیح تقسیم بر مجموع منفی صحیح و مثبت کاذب). درستی شناسایی میدانی برای هر گونه براساس مجموع تعداد نمونه‌های مثبت صحیح و منفی صحیح، تقسیم بر تعداد نمونه‌های سرگین در هر چهار حالت ممکن محاسبه شد (Morin و همکاران، ۲۰۱۶).

## نتایج

در مجموع، ۲۹۰ کیلومتر پیمایش پیاده در طول ۳۴ روز تلاش نمونه‌برداری فرصت‌طلبانه در ۶ منطقه مورد مطالعه انجام شد، که بیش‌تر آن(۷۱ درصد طول پیمایش) در ارسباران بود (جدول ۱). هیچ نمونه‌ای در مراکان و لیسار یافت نشد. ۱۷۴ نمونه سرگین گوشت‌خوار در طول پیمایش‌های میدانی از چهار منطقه دیگر گردآوری شدند (شکل ۲) که به‌صورت میانگین برابر ۰/۲۴ (کنتال)، ۰/۶۹ (ارسباران)، ۰/۹۳ (آق‌داغ) و ۰/۵ (انگوران) سرگین به‌ازای هر کیلومتر پیمایش میدانی فرصت‌طلبانه در هر منطقه بودند. به‌جز ۶ نمونه (۳/۵ درصد)، گونه احتمالی مربوط به سرگین برای سایر نمونه‌ها در مرحله میدانی تعریف شد. ۶۷/۲ درصد نمونه‌های گردآوری‌شده (۱۱۷ سرگین) با موفقیت برای توالی مورد نظر سیتوکروم *b*، تکثیر و تا سطح گونه شناسایی شدند(جدول ۱).درمجموع، ۶ گونه گوشت‌خوار در نمونه‌های گردآوری‌شده شناسایی شدند (جدول ۱، شکل ۲). بیش‌ترین تعداد نمونه گردآوری و شناسایی‌شده مربوط به خرس قهوه‌ای و کم‌ترین متعلق به گربه وحشی و شنگ (*Lutra lutra*) بودند (جدول ۱). نشانگر میتوکندری استفاده‌شده قادر به تفکیک قطعی نمونه‌های گرگ (*Canis lupus*) از سگ (*C. l. familiaris*) و گربه وحشی از گربه اهلی



www.SID.ir

Archive of SID



(*F. catus*) یا دورگه‌های احتمالی آنان نبود. با توجه به پرهیز از نمونه‌برداری در نزدیکی مناطق روستایی، چراگاه‌ها و مسیرهای رفت و آمد دام اهلی و دقت در سایر نمایه‌های پیرامون هر سرگین، نمونه‌برداری از سرگین این گوشت‌خواران اهلی، غیرمحتمل در نظر گرفته‌شد. به‌جز شنگ و گربه وحشی که به‌ترتیب تنها از نمونه‌های آق‌داغ وارسباران شناسایی ژنتیکی شدند، باقی گوشت‌خواران شناسایی شده از این دو منطقه مورد مطالعه با یکدیگر مشترک بودند (جدول ۱).

از ۶ سرگینی که توافق درباره گونه مربوط به آنان در روش میدانی حاصل نشد، سه سرگین مربوط به سمور سنگی، ۲ سرگین روباه معمولی و یک سرگین بدون موفقیت تکثیر در شناسایی ژنتیکی بودند. در میان گوشت‌خوارانی که با روش ژنتیکی شناسایی شدند، کم‌ترین نرخ شناسایی درست سرگین در طبیعت (نرخ مثبت صحیح) مربوط به گربه وحشی و شنگ (۰) و بیش‌ترین مربوط به خرس قهوه‌ای (۰/۹۴) بود (جدول ۲). بیش‌ترین نرخ اشتباه در شناسایی سرگین در طبیعت (نرخ مثبت کاذب) به سمور سنگی (۰/۰۷) تعلق داشت. در مقابل، بیش‌ترین نرخ رد اشتباه یک سرگین (نرخ منفی کاذب) مربوط به گربه وحشی (۱/۰) و روباه معمولی (۰/۹۲) بود (جدول ۲). در مجموع، توانایی میدانی در رد صحیح گونه غیرمرتبط با یک سرگین (نرخ منفی صحیح) برای همه گونه‌ها بالا بود (جدول ۲). در نتیجه، درستی شناسایی برای همه گونه‌ها بالا محاسبه شد (جدول ۲). مقایسه نرخ مثبت کاذب براساس نقش گونه‌ها در تشخیص اشتباه سرگین یک گونه برای یک گونه دیگر (شکل ۳) نشان داد که بیش‌ترین اشتباه در تفکیک سرگین خرس از سایر گونه‌ها (گراز *Sus scrofa*؛ ۰/۱۱) و روباه از سمور سنگی (۰/۰۵) اتفاق افتاده است. شناسایی ژنتیکی سرگین‌های احتمالی پلنگ (*Panthera pardus*) موفقیتی در پی نداشت (۴ نمونه از کنتال) یا پس از تکثیر DNA رد شد (جدول ۲، شکل ۳). یک سرگین مشکوک به لینکس یا سیاه‌گوش (*Lynx lynx*) در ارسباران (شکل ۲) نیز در شناسایی ژنتیکی به گربه وحشی تعلق یافت (سایر در شکل ۳).

**جدول ۱: نتایج نمونه‌برداری سرگین گوشت‌خواران و شناسایی ژنتیکی آن‌ها در مناطق مورد مطالعه (خرداد تا مهر ۱۳۹۱)**

| | مراکان | کنتال | ارسباران | لیسار | آق‌داغ | انگوران |
|---|---|---|---|---|---|---|
| مسیر پیمایش‌شده به کیلومتر | ۱۵ | ۱۷ | ۲۰۶ | ۲۱ | ۲۷ | ۴ |
| روز (ساعت) تلاش نمونه‌برداری | ۲ (۶) | ۲ (۱۳) | ۲۲ (۱۴۵) | ۳ (۱۸) | ۴ (۲۱) | ۱ (۵) |
| نمونه‌های سرگین گردآوری‌شده | ۰ | ۴ | ۱۴۳ | ۰ | ۲۵ | ۲ |
| سرگین‌های شناسایی‌شده با روش ژنتیکی* ( درصد) | ۰ (۰) | ۰ (۰) | ۹۱ (۶۳/۶) | ۰ (۰) | ۲۴ (۹۶) | ۲ (۱۰۰) |
| خرس قهوه‌ای (*Ursus arctos*) | ۰ | ۰ | ۶۹ | ۰ | ۱۳ | ۰ |
| گربه وحشی (*Felis silvestris/lybica*) | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۰ | ۰ |
| گرگ (*Canis lupus*) | ۰ | ۰ | ۶ | ۰ | ۲ | ۱ |
| روباه معمولی (*Vulpes vulpes*) | ۰ | ۰ | ۱۰ | ۰ | ۱ | ۱ |
| سمور سنگی (*Martes foina*) | ۰ | ۰ | ۴ | ۰ | ۶ | ۰ |
| شنگ (*Lutra lutra*) | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ |

* شناسایی گونه برای هر نمونه سرگین براساس تکثیر یک توالی ۱۸۹ جفت‌باز از سیتوکروم *b* در DNA میتوکندری و به کمک جست‌وجو با BLASTn در GenBank انجام شد.

**شکل ۲: نمونه سرگین گوشت‌خواران از مناطق مورد مطالعه که به روش ژنتیکی شناسایی شدند: ۱ و ۲. خرس قهوه‌ای (*Ursus arctos*)، ۳. گرگ (*Canis lupus*)،**



www.SID.ir

Archive of SID

**شکل ۲: نمونه سرگین گوشت‌خواران از مناطق مورد مطالعه که به روش ژنتیکی شناسایی شدند: ۴. روباه معمولی (*Vulpes vulpes*)، ۵. گربه وحشی (*Felis silvestris/lybica*) و ۶. سمور سنگی (*Martes foina*)**

**جدول ۲: سنجش درستی شناسایی سرگین‌های گردآوری‌شده گوشت‌خواران از مناطق مورد مطالعه؛ مقایسه روش میدانی مبتنی بر ویژگی‌های ظاهری (شناسایی احتمالی) با روش نمونه‌برداری غیر تهاجمی DNA (شناسایی قطعی)**

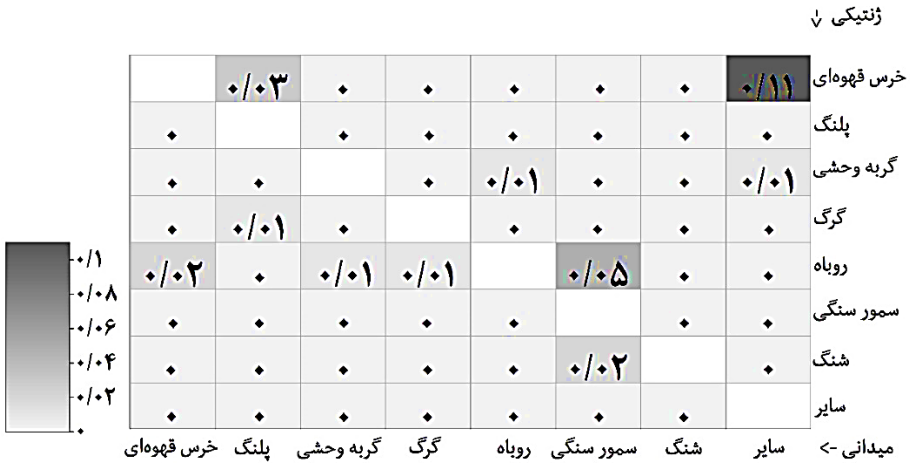
| گونه (نام علمی) | فراوانی سرگین گردآوری‌شده با هر روش شناسایی | | | | سنجش درستی | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | شناسایی ژنتیکی (قطعی) | | | نرخ مثبت صحیح |
| | | | مثبت | منفی | مجموع | نرخ مثبت کاذب |
| خرس قهوه‌ای (*Ursus arctos*) | شناسایی میدانی (احتمالی) | مثبت | ۷۷ | ۲ | ۷۹ | نرخ منفی کاذب |
| | | منفی | ۵ | ۳۳ | ۳۸ | نرخ منفی صحیح |
| | | مجموع | ۸۲ | ۳۵ | ۱۱۷ | درستی شناسایی |
| | | | شناسایی ژنتیکی (قطعی) | | | نرخ مثبت صحیح |
| | | | مثبت | منفی | مجموع | نرخ مثبت کاذب |
| پلنگ (*Panthera pardus*) | شناسایی میدانی (احتمالی) | مثبت | ۰ | ۲ | ۲ | نرخ منفی کاذب |
| | | منفی | ۰ | ۱۱۵ | ۱۱۵ | نرخ منفی صحیح |
| | | مجموع | ۰ | ۱۱۷ | ۱۱۷ | درستی شناسایی |
| | | | شناسایی ژنتیکی (قطعی) | | | نرخ مثبت صحیح |
| | | | مثبت | منفی | مجموع | نرخ مثبت کاذب |
| گربه وحشی (*Felis silvestris/lybica*) | شناسایی میدانی (احتمالی) | مثبت | ۰ | ۱ | ۱ | نرخ منفی کاذب |
| | | منفی | ۲ | ۱۱۴ | ۱۱۶ | نرخ منفی صحیح |
| | | مجموع | ۲ | ۱۱۵ | ۱۱۷ | درستی شناسایی |
| | | | شناسایی ژنتیکی (قطعی) | | | نرخ مثبت صحیح |
| | | | مثبت | منفی | مجموع | نرخ مثبت کاذب |
| گرگ (*Canis lupus*) | شناسایی میدانی (احتمالی) | مثبت | ۸ | ۱ | ۹ | نرخ منفی کاذب |
| | | منفی | ۱ | ۱۰۷ | ۱۰۸ | نرخ منفی صحیح |
| | | مجموع | ۹ | ۱۰۸ | ۱۱۷ | درستی شناسایی |
| | | | شناسایی ژنتیکی (قطعی) | | | نرخ مثبت صحیح |
| | | | مثبت | منفی | مجموع | نرخ مثبت کاذب |
| روباه معمولی (*Vulpes vulpes*) | شناسایی میدانی (احتمالی) | مثبت | ۱ | ۱ | ۲ | نرخ منفی کاذب |
| | | منفی | ۱۱ | ۱۰۴ | ۱۱۵ | نرخ منفی صحیح |
| | | مجموع | ۱۲ | ۱۰۵ | ۱۱۷ | درستی شناسایی |
| | | | شناسایی ژنتیکی (قطعی) | | | نرخ مثبت صحیح |
| | | | مثبت | منفی | مجموع | نرخ مثبت کاذب |
| سمور سنگی (*Martes foina*) | شناسایی میدانی (احتمالی) | مثبت | ۷ | ۷ | ۱۴ | نرخ منفی کاذب |
| | | منفی | ۳ | ۱۰۰ | ۱۰۳ | نرخ منفی صحیح |
| | | مجموع | ۱۰ | ۱۰۷ | ۱۱۷ | درستی شناسایی |
| | | | شناسایی ژنتیکی (قطعی) | | | نرخ مثبت صحیح |
| | | | مثبت | منفی | مجموع | نرخ مثبت کاذب |
| شنگ (*Lutra lutra*) | شناسایی میدانی (احتمالی) | مثبت | ۰ | ۰ | ۰ | نرخ منفی کاذب |
| | | منفی | ۲ | ۱۱۵ | ۱۱۷ | نرخ منفی صحیح |
| | | مجموع | ۲ | ۱۱۵ | ۱۱۷ | درستی شناسایی |



www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۳: نرخ تشخیص میدانی اشتباه (نرخ مثبت کاذب) برای هر گونه گوشت‌خوار که شناسایی میدانی سرگین (محور افقی) به روش ژنتیکی رد شد و به گونه دیگری (محور عمودی) مربوط دانسته‌شد.**

اعداد بزرگ‌تر نشان‌دهنده احتمال بیش‌تر خطا در شناسایی میدانی سرگین یک گوشت‌خوار (محور عمودی) از یک گونه هم‌بوم آن (محور افقی) است.

## بحث

مزایای فراوان روش‌های غیرتهاجمی سبب شده که اکنون به یکی از ابزارهای اصلی پیمایش و پایش جمعیت‌های جانوری به‌ویژه گوشت‌خواران تبدیل شوند (Michalski و همکاران، ۲۰۱۱؛ Kelly و همکاران، ۲۰۱۲؛ Lonsinger و همکاران، ۲۰۱۵). تمرکز پژوهش بر پستانداران گوشت‌خوار از این روست که بسیاری از اعضای این راسته جانوران در خطر انقراض قرار دارند، گوشت‌خواران با جذابیت ذاتی و تقابل تاریخی با منافع انسان توجه‌ها را به خود معطوف می‌کنند و نقش گوشت‌خواران در شکل‌دهی به بوم‌سامانه (Ecosystem) خود با وجود در اقلیت قرارداشتن از نظر ذی‌توده، غیرقابل انکار است (Ripple و همکاران، ۲۰۱۴). در یک دهه گذشته پژوهش‌های روزافزونی درباره گوشت‌خواران ایران انجام شده‌است که از میان ابزارهای غیرتهاجمی، دوربین‌های تله‌ای بیش‌ترین کاربرد را تاکنون داشته‌اند(Ghoddousi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Fahimi و همکاران، ۲۰۱۱؛ Farhadinia و همکاران، ۲۰۱۳). پژوهش پیش رو یکی از نخستین تلاش‌ها برای استفاده از نمونه‌برداری غیرتهاجمی DNA در پایش حیات وحش در ایران و افزایش دقت داده‌های میدانی است. نتایج این پژوهش مقدماتی، کاربرد این روش را به‌عنوان ابزار اصلی پژوهشی یا در ترکیب با سایر روش‌های غیرتهاجمی با توجه به اهداف یک پژوهش ثابت می‌کند. نتایج این پژوهش بر وجود خطای درخور توجه در شناسایی میدانی نمایه‌های حیات وحش در طبیعت تاکید می‌کند (Monterroso و همکاران، ۲۰۱۳؛ Morin و همکاران، ۲۰۱۶) که می‌بایست در تحلیل نتایج درنظر گرفته شود. کارکرد روش ردزنی در طبیعت بسته به دانش و تجربه افراد شرکت‌کننده در پیمایش میدانی می‌تواند متفاوت باشد. برآیند تجربه نیروهای میدانی این پژوهش (حداقل پنج سال) را می‌توان نماینده مناسبی برای سنجش درستی روش‌های سنتی تشخیص نمایه در مقایسه با روش‌های ژنتیکی درنظر گرفت(Davidson و همکاران، ۲۰۰۲؛Harrington و همکاران، ۲۰۱۰). برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که گروهی از مردم بومی یک منطقه که پیشینه بلندمدت در ردزنی حیات وحش دارند، توانایی چشمگیری در تشخیص درست نمایه‌های به‌جامانده از جانوران در طبیعت دارند (Prugh و Ritland، ۲۰۰۵؛ Elbroch و همکاران، ۲۰۱۱). استفاده از این دانش بومی در مقایسه با روش‌های پیشرفته غیرتهاجمی، ارزان‌تر است و ظرفیت درگیرساختن مردم محلی در فرآیند مدیریت منابع طبیعی و حفاظت از گونه‌های در خطر را نیز دارد. حتی در صورت وجود این دانش بومی نادر در مناطقی از ایران، چالش جدی در بهره‌گیری از آن وجود دارد که شامل دشواری شناسایی افراد کارآزموده، ارزیابی دقت آنان و چگونگی استفاده کارآمد از نتایج و تحلیل صحیح آن با استفاده از این دانش بومی است (Elbroch و همکاران، ۲۰۱۱). چنین دشواری‌هایی مانع از جایگزینی گسترده روش‌های قابل اتکا مانند نمونه‌برداری غیرتهاجمی DNA با دانش بومی خواهد شد.

دو حالت کلی بروز خطا در شناسایی میدانی نمایه‌های حیات وحش (مثبت کاذب و منفی کاذب) اثر متفاوتی بر نتایج یک پژوهش می‌گذارند. حداکثر تلاش پژوهشگر می‌بایست بر کاهش نرخ مثبت کاذب با به حداقل‌رساندن احتمال گردآوری اشتباه نمونه‌های سایر گونه‌ها با فرض تعلق به یک گونه دیگر باشد. پژوهش‌هایی برای درک بهتر اثر این خطا بر منحرف‌ساختن نتایج و تفسیرها انتشار یافته‌اند.



www.SID.ir

Archive of SID



Harrington و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که با وجود استفاده از نیروهای میدانی باتجربه، همه سرگین‌های گردآوری‌شده با فرض تعلق به گونه مهاجم مینک آمریکایی (*Neovison vison*) به سایر گوشت خواران هم‌بوم هم‌چون سمور جنگلی (*M. martes*) و روباه تعلق داشتند. درصورت تکیه بر دانش میدانی نمونه‌بردار، تا ۳۴ درصد مناطق پیمایش‌شده برای ارزیابی حضور مینک آمریکایی به‌اشتباه مثبت تلقی می‌شدند که در نتیجه به برنامه‌ریزی گسترده برای مقابله با این گوشت‌خوار غیر بومی و مهاجم در محدوده مورد مطالعه منجر می‌شد که بسیار پرهزینه و زمان‌بر ولی بدون فایده می‌بود. در نمونه دیگر، شناسایی سرگین دو گربه‌سان بزرگ جگوار (*Panthera onca*) و پوما (*Puma concolor*) که هم‌بوم با یکدیگر در بسیاری از زیستگاه‌های آمریکای مرکزی و جنوبی هستند، با روش میدانی ممکن است تا ۸۳ درصد دارای خطا باشد که به تفسیرهای کاملاً اشتباهی از رفتار و الگوی مکانی-زمانی طعمه‌خواری هر یک از این گوشت خواران منتهی خواهد شد (Martínez-Gutiérrez و همکاران، ۲۰۱۵). در حالت دوم بروز خطا در نمونه‌برداری (منفی کاذب)، بخشی از نمونه‌هایی که امکان استفاده در تحلیل نتایج را دارند به‌دلیل عدم تشخیص قطعی گونه مربوط به آن، از نمونه‌برداری حذف می‌شوند. افزون‌بر احتمال نادیده‌گرفتن حضور گونه هدف، افزایش نرخ منفی کاذب به کاهش اندازه نمونه و در نتیجه کاهش قدرت در تحلیل بخشی از نتایج منتهی خواهد شد. در این پژوهش بدون استفاده از روش ژنتیکی، نمونه‌بردار قادر به شناسایی قطعی حضور گربه وحشی و شنگ در نمونه‌ها نبود. افزایش تلاش نمونه‌برداری تا حدودی اثر کمبود نمونه‌ها را به‌دلیل نرخ منفی کاذب کاهش خواهد داد. از سوی دیگر، استفاده از رویکردهای تحلیلی که امکان در نظرگرفتن ناتوانی نمونه‌بردار در تشخیص صد در صد حضور یک گونه را در یک منطقه فراهم می‌کنند (Imperfect detection) (Kellner و Swihart، ۲۰۱۴)، یکی از راهکارهای شناسایی این خطا و پاسخ‌دهی مناسب به آن است. خطای بالا در تفکیک سرگین گوشت‌خواران از یکدیگر به گونه یا زیستگاه خاصی محدود نیست (Reed و همکاران، ۲۰۰۴؛ Anwar و همکاران، ۲۰۱۱). سرگین گوشت‌خواران کوچکی مانند روباه معمولی و سمور سنگی که طیف مختلفی از مواد غذایی جانوری و گیاهی را مصرف‌می‌کنند،دارای ویژگی‌های ظاهری و شرایط دفع بسیار متغیری است (شکل ۲) که تشخیص آن‌ها را از یکدیگر دشوار می‌کند (Monterroso و همکاران، ۲۰۱۳). ولی تشخیص سرگین خرس به دلیل اندازه اغلب بسیار بزرگ سرگین و نمایان‌بودن مواد گیاهی با هضم ضعیف در آن، به‌آسانی صورت می‌گیرد (Morin و همکاران، ۲۰۱۶). با این‌وجود، پیش‌فرض حجیم‌دانستن سرگین خرس و حضور میوه در آن نیز ممکن است نمونه‌بردار را گمراه کند (شکل ۲). هیچ یک از پژوهش‌های انتشاریافته‌ای که تاکنون به ارزیابی رژیم غذایی گوشت‌خواران ایران پرداخته‌اند از روش مطمئنی برای تایید سرگین گونه هدف استفاده نکرده‌اند (مانند حسینی‌زوارئی و همکاران، ۱۳۹۴؛ رضایی‌خوزانی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Ghoddousi و همکاران، ۲۰۱۶؛ زارعی و پیروی‌لطیف، ۱۳۹۶). تشخیص دقیق گونه هدف در هر مرحله از تحلیل داده‌ها برای تفسیر صحیح نتایج و برآورد درست اثر عوامل گوناگون ضروری است (Morin و همکاران، ۲۰۱۶).

شناسایی ژنتیکی گوشت‌خواران با استفاده از توالی‌های ژنی میتوکندریایی مانند ناحیه کنترل، زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز (COI)، سیتوکروم *b*، ۱۲S rRNA و ۱۶S rRNA یا نشانگرهای DNA هسته مانند ریزماهواره‌ها، به چندین روش آزمایشگاهی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مانند توالی‌یابی نشانگرهای آگاهی‌دهنده DNA (Diagnostic DNA markers)، چندشکلی طولی قطعات محدودشده (PCR-RFLP)، تکثیر با آغازگرهای اختصاصی هر گونه و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمّی یا زمان‌واقعی (real-time PCR) انجام می‌شوند (Fernandes و همکاران، ۲۰۰۸؛ Chaves و همکاران، ۲۰۱۲؛ Nowak و همکاران، ۲۰۱۴؛ زمانی و همکاران، ۱۳۹۳). هر یک از این روش‌ها دارای مزایا و ضعف‌هایی هستند که براساس اهداف یک پژوهش، نوع و کیفیت نمونه زیستی مورد استفاده، امکانات در دسترس و زمان و بودجه موجود انتخاب می‌شوند. Nowak و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که توالی کوتاه (کم‌تر از ۲۵۰ جفت‌باز) سیتوکروم *b*، ۱۲S rRNA و ۱۶S rRNA بهترین کارایی را در شناسایی نمونه‌های غیرتهاجمی سرگین و موی گوشت‌خواران اروپا شامل پنج گونه این مطالعه دارند. افزون‌بر موفقیت بالای تکثیر توالی ژنی سیتوکروم *b* به‌دلیل وجود صدها تا هزاران نسخه از مولکول DNA میتوکندری در هر سلول، این توالی‌های کوتاه چندشکلی دارای واگرایی بالایی بین گونه‌ها هستند و طول کوتاه آن‌ها به موفقیت تکثیر بالاتر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نمونه‌های تحلیل‌رفته مانند DNA سرگین منجر می‌شود (Farrell و همکاران، ۲۰۰۰؛ Michalski و همکاران، ۲۰۱۱). هم‌چنین، برای همه گوشت‌خواران خشکی‌زی شناخته‌شده، حداقل یک توالی آگاهی‌دهنده سیتوکروم *b* در بانک ژن وجود دارد که امکان مقایسه برای شناسایی گونه نامعلوم را امکان‌پذیر می‌سازد (Chaves و همکاران، ۲۰۱۲). با این‌وجود، استفاده از تنها یک جفت آغازگر کوتاه سیتوکروم *b* دارای ضعف‌هایی مانند ناتوانی یا خطای به‌نسبت بالا در تشخیص برخی گونه‌های نزدیک به‌هم یا دارای همبستگی عمیق ژنومی، دورگه‌ها و زاده‌های آنان است که می‌بایست در پژوهش‌های آتی مورد توجه قرار گیرد (Chaves و همکاران، ۲۰۱۲؛ Nowak و همکاران، ۲۰۱۴).



www.SID.ir

Archive of SID



یکی از مشکلات کار با نمایه‌های زیستی در آن است که تنها بخشی از نمونه‌های گردآوری‌شده در نهایت با موفقیت تکثیر می‌شوند. DNA گونه هدف در نمایه‌های زیستی به محض دفع در معرض تخریب تدریجی قرار دارد. دما، نور فرابنفش خورشید و رطوبت محیط در کنار مواد غذایی دفعی (در مورد سرگین) و روش نمونه‌برداری و نگه‌داری بر کاهش موفقیت تکثیر اثرگذارند (Michalski و همکاران، ۲۰۱۱؛ Monterroso و همکاران، ۲۰۱۳؛ Lonsinger و همکاران، ۲۰۱۵). مراحل آزمایشگاهی یک پژوهش معمولاً پس از پایان نمونه‌برداری میدانی آغاز می‌شود و به دشواری امکان بازگشت به منطقه و گردآوری نمونه‌های بیش‌تر برای جبران نمونه‌برداری ناکافی وجود خواهد داشت. یکی از راهکارهای پیشگیری از این مشکل، افزایش احتمال موفقیت تکثیر DNA هدف با تمرکز نمونه‌برداری بر نمونه‌های تازه است (Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹؛ Michalski و همکاران، ۲۰۱۱). با توجه به اهداف این پژوهش، همه سرگین‌ها به شرط عدم تخریب و عدم فعالیت مشهود قارچی یا لارو حشرات در آن‌ها گردآوری شدند. با این‌وجود، بررسی‌های اولیه پیشنهاد می‌کند که بالاترین نرخ موفقیت در تکثیر به سرگین‌های بسیار تازه با لایه درونی و بیرونی نرم با بوی شدید بدون نیاز به شکستن سرگین مربوط بودند. هم‌چنین نمونه‌هایی که در بستر خشک و در روزهای بدون سابقه بارندگی گردآوری شدند (شرایط نمونه‌برداری در آق‌داغ) بالاترین موفقیت تکثیر را داشتند. با توجه به اثردهی هم‌زمان عوامل کاهش موفقیت تکثیر بر کیفیت و کمیت DNA گونه هدف (Monterroso و همکاران، ۲۰۱۳؛ Lonsinger و همکاران، ۲۰۱۵)، پیشنهاد می‌شود با درنظر گرفتن اهداف یک پژوهش و شرایط منطقه مورد مطالعه، نمونه‌برداری با به‌کارگیری بهترین روش نگه‌داری (Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹) بر نمونه‌های تازه در بازه زمانی با حداقل میزان رطوبت محیط (تابستان یا زمستان خشک) متمرکز شود.

هزینه نمونه‌برداری تهاجمی DNA یکی از دشواری‌های اصلی در بهره‌گیری از آن در پایش حیات‌وحش است (Beja-Pereira و همکاران، ۲۰۰۹؛ Harrington و همکاران، ۲۰۱۰). در یک پژوهش مقدماتی می‌توان به برآوردی از تعداد نمونه مورد نیاز برای پاسخ به پرسش‌های اصلی و هزینه‌های گردآوری داده و تحلیل آنان رسید (Lonsinger و همکاران، ۲۰۱۵). هدف نهایی رسیدن به بیشینه موفقیت در آزمایشگاه با کمینه هزینه اجرا است. پیشرفت مداوم این روش پژوهشی به کاهش هزینه‌های آن در طول زمان منجر شده‌است. در این پژوهش، میانگین هزینه تحلیل ژنتیکی هر سرگین در آزمایشگاه (تکثیر موفق یا ناموفق) در حدود ۲۵،۰۰۰ تومان، بدون دستمزدی برای نیروی آزمایشگاهی بود. دسترسی به برخی تجهیزات به‌روز مورد نیاز ممکن است عامل محدودکننده یا افزایش‌دهنده هزینه‌ها در ایران باشد. برای نمونه، کیت تجاری استخراج DNA که در این پژوهش استفاده شد، برای کار با نمونه‌های زیستی با کیفیت و کمیت پایین DNA هدف مانند سرگین بهترین عملکرد را دارد (Fernandes و همکاران، ۲۰۰۸).

هزینه بالا و دشواری تهیه کیت‌های باکیفیت در ایران، ممکن است پژوهشگران را ناگزیر به استفاده از کیت‌های استخراج موجود در بازار کند که ارزان‌تر هستند ولی کارایی محدودتری در پژوهش‌های مبتنی بر نمونه‌برداری غیرتهاجمی دارند. برخی مراحل آزمایشگاهی نیز در حال حاضر نیازمند ارسال محصول به آزمایشگاه‌های خارج از ایران برای تحلیل بخشی از نتایج هستند. با درنظرگرفتن اهداف هر پژوهش و روش‌هایی که برای پاسخ به پرسش‌ها وجود دارد، پژوهشگران می‌توانند هزینه و فایده هر روش را درنظر گرفته و براساس آن اقدام کنند. نتایج این پژوهش، پایه‌ای را برای پژوهش‌های آتی به کمک روش‌های ژنتیکی غیرتهاجمی فراهم می‌سازد.

## تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نویسنده است که بخشی از هزینه‌های آن توسط دانشگاه لوند، گروه متخصصان گربه‌سانان اتحادیه جهانی حفاظت از طبیعت و خیریه مردم برای گونه‌های در خطر (PTES) تقبل شده‌است. نمونه‌برداری در انگوران در ادامه یک پژوهش جداگانه و با همکاری اداره حفاظت محیط زیست شهرستان ماه‌نشان و در سایر مناطق مورد مطالعه با مجوز شماره ۹۱/۱۴۲۱۶ سازمان حفاظت محیط زیست در تاریخ ۱۳۹۱/۰۴/۱۹ انجام شده‌است که از دو دفتر تنوع زیستی و حیات وحش و حفاظت و مدیریت شکار و صید برای همکاری در این راستا سپاسگزاری می‌شود. اداره کل حفاظت محیط زیست استان‌های موضوع مطالعه و نمایندگی آن‌ها در شهرستان‌های خوی، جلفا، کلیبر، خلخال و تالش در تسهیل انجام این پژوهش نقش داشتند. آقایان بهنام قربانی، آرش محرمی، فرشید جعفرزاده، جواد وظیفه، باقر نظامی بلوچی، محمدصادق فرهادی‌نیا، خانم سمانه فائزی و تعدادی از محیط‌بانان مناطق مورد مطالعه در برخی از سفرهای میدانی این پژوهش همکاری کردند که از همگی آنان سپاسگزاری می‌شود. از دکتر بهرام کیابی به‌دلیل ارائه مشاوره و از خانم مهدیه طورانی برای خواندن پیش‌نویسی از این مقاله و ارائه نظرات خود سپاسگزاری می‌شود. این پژوهش به قربانیان و بازماندگان زمین‌لرزه شهرستان‌های اهر، ورزقان و هریس تقدیم می‌شود که در زمان نمونه‌برداری این پژوهش در بخشی از مناطق مورد بررسی روی داد.



www.SID.ir

Archive of SID



## منابع


۱. **اشرف‌زاده، م.ر.، ۱۳۹۴.** تبار گیتاشناسی خرس قهوه‌ای (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) در ایران. رساله دکتری. گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی. دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲. **حسینی‌زوارئی، ف.؛ محمدی‌مقانکی، ا.؛ فرهادی‌نیا، م.ص.؛ سهرابی‌نیا، ص.؛ جعفرزاده، ف. و شعربافی، ا.، ۱۳۹۴.** طعمه خواری گرگ (*Canis lupus*) از دام اهلی و اثر آن بر نگرش و اقتصاد مردم محلی در پناهگاه حیات وحش انگوران، استان زنجان. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. دوره ۷، شماره ۴، صفحات ۲۱ تا ۳۰.

۳. **درویش‌صفت، ع.ا.، ۱۳۸۵.** اطلس مناطق حفاظت‌شده ایران. چاپ نخست. دانشگاه تهران، ایران. ۱۵۷ صفحه.

۴. **رضایی‌خوزانی، ع.؛ کابلی، م.؛ اشرفی، س. و اکبری، ح.، ۱۳۹۴.** بررسی هم‌پوشانی رژیم غذایی یوزپلنگ آسیایی و پلنگ ایرانی در منطقه حفاظت‌شده کوه بافق. دومین همایش یافته‌های نوین در محیط زیست و اکوسیستم‌های کشاورزی. پژوهشکده انرژی‌های نو و محیط زیست دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۵. **زارعی، ع.ا. و پیروی‌لطیف، ش.، ۱۳۹۶.** پهنای آشیان بوم‌شناختی و رژیم غذایی شغال طلایی (*Canis aureus*) در ناحیه کوه‌چنار شهرستان ارسنجان - استان فارس. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. سال ۹، شماره ۱، صفحات ۵۷ تا ۶۴.

۶. **زمانی، ز.؛ رضایی، ح.؛ عقیلی، س.م.؛ اسدی‌آقبلاغی، م.؛ شعبانی، ع. و زمانی، ن.، ۱۳۹۳.** شناسایی گوشت‌خواران بزرگ‌جثه براساس پلی‌مورفیسم طول ناحیه کنترل DNA میتوکندری در ایران. پژوهش‌های محیط زیست. سال ۵، شماره ۱۰، صفحات ۲۱۱ تا ۲۱۷.

۷. **نصیری‌مقدم، ن.؛ علی‌آبادیان، م.؛ کابلی، م.؛ کرمی، م.؛ فرحمند، ح.؛ منتظمی، ش. و پرتولدی، چ.، ۱۳۹۳.** ساختار ژنتیکی گورایرانی (*Equus hemionus onager*) در ذخیره‌گاه زیست‌کره توران و منطقه حفاظت‌شده بهرام گور. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. سال ۶، شماره ۱۸، صفحات ۱۹ تا ۲۸.

۸. **Anwar, M.B.; Jackson, R.; Nadeem, M.S.; Janečka, J.E.; Hussain, S.; Beg, M.A.; Muhammad, G. and Qayyum, M., 2011.** Food habits of the snow leopard *Panthera uncia* (Schreber, 1775) in Baltistan, Northern Pakistan. Eur. J. Wildl. Res. Vol. 57, No. 5, pp: 1077-1083.

۹. **Beja-Pereira, A.; Oliveira, R.; Alves, P.C.; Schwartz, M.K. and Luikart, G., 2009.** Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. Mol. Ecol. Resour. Vol. 9, No. 5, pp: 1279-1301.

۱۰. **Chame, M., 2003.** Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. No. 98, pp: 71-94.

۱۱. **Chaves, P.B.; Graeff, V.G.; Lion, M.B.; Oliveira, L.R. and Eizirik, E., 2012.** DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. Mol. Ecol. Resour. Vol. 12, No. 1, pp: 18-35.

۱۲. **Davison, A.; Birks, J.D.; Brookes, R.C.; Braithwaite, T.C. and Messenger, J.E., 2002.** On the origin of faeces: morphological versus molecular methods for surveying rare carnivores from their scats. J. Zool. (London). Vol. 257, No. 2, pp: 141-143.

۱۳. **Elbroch, M.; Mwampamba, T.H.; Santos, M.J.; Zylberberg, M.; Liebenberg, L.; Minye, J.; Mosser, C. and Reddy, E., 2011**. The value, limitations, and challenges of employing local experts in conservation research. Conserv. Biol. Vol. 25, No. 6, pp: 1195-1202.

۱۴. **Fahimi, H.; Yusefi, G.H.; Madjdzadeh, S.M.; Damangir, A.A.; Sehhatisabet, M.E. and Khalatbari, L., 2011.** Camera traps reveal use of caves by Asiatic black bears (*Ursus thibetanus gedrosianus*) (Mammalia: Ursidae) in southeastern Iran. Journal of Nat. Hist. Vol. 45, No. 37-38, pp: 2363-2373.

۱۵. **Farhadinia, M.S.; Akbari, H.; Mousavi, S.J.; Eslami, M.; Azizi, M.; Shokouhi, J.; Gholikhani, N. and Hosseini Zavarei, F., 2013.** Exceptionally long movements of the Asiatic cheetah *Acinonyx jubatus venaticus* across multiple arid reserves in central Iran. Oryx. Vol. 47, No. 3, pp: 427-430.

۱۶. **Farrell, L.E.; Roman, J. and Sunquist, M.E., 2000.** Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. Mol. Ecol. Vol. 9, No. 10, pp: 1583-1590.

۱۷. **Fernandes, C.A.; Ginja, C.; Pereira, I.; Tenreiro, R.; Bruford, M.W. and Santos Reis, M., 2008.** Species specific mitochondrial DNA markers for identification of non invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. Conserv. Genet. Vol. 9, No. 3, pp: 681-690.

۱۸. **Ghoddousi, A.; Hamidi, A.K.; Ghadirian, T.; Ashayeri, D. and Khorozyan, I., 2010.** The status of the endangered Persian leopard *Panthera pardus saxicolor* in Bamu National Park, Iran. Oryx. Vol. 44, No. 4, pp: 551-557.

۱۹. **Ghoddousi, A.; Soofi, M.; Hamidi, A.K.; Lumetsberger, T.; Egli, L.; Khorozyan, I.; Kiabi, B.H. and Waltert, M., 2016.** Assessing the role of livestock in big cat prey choice using spatiotemporal availability patterns. PloS ONE. Vol. 11, No. 4, pp: 1-16. e0153439.

۲۰. **Hall, T.A., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. Nucl Acids Symp Ser. Vol. 41, pp: 95-98.

۲۱. **Harrington, L.A.; Harrington, A.L.; Hughes, J.; Stirling, D. and Macdonald, D.W., 2010.** The accuracy of scat identification in distribution surveys: American mink, *Neovison vison*, in the northern highlands of Scotland. Eur. J. Wildl. Res. Vol. 56, No. 3, pp: 377-384.

۲۲. **Hebert, L.; Darden, S.K.; Pedersen, B.V. and Dabelsteen, T., 2011.** Increased DNA amplification success of non invasive genetic samples by successful removal of inhibitors from faecal samples collected in the field. Conserv. Genet. Resour. Vol. 3, No. 1, pp: 41-43.

۲۳. **Kellner, K.F. and Swihart, R.K., 2014.** Accounting for imperfect detection in ecology: a quantitative review. PLoS ONE. Vol. 9, No. 10, pp: 1-8. e111436.

۲۴. **Kelly, M.J.; Betsch, J.; Wultsch, C.; Mesa, B. and Mills, L.S., 2012.** Noninvasive sampling for carnivores. In Carnivore ecology and conservation: a handbook of techniques. Edited by L Boitani and RA Powell. Oxford University Press, New York, USA. pp: 47-69.

۲۵. **Khosravi, R.; Hemami, M.R.; Malekian, M.; Silva, T.L.; Rezaei, H.R. and Brito, J.C., 2017.** Effect of landscape




www.SID.ir

Archive of SID



features on genetic structure of the goitered gazelle (*Gazella subgutturosa*) in Central Iran. Conserv. Genet. pp: 1-4.

۲۶. **Lonsinger, R.C.; Gese, E.M.; Dempsey, S.J.; Kluever, B.M.; Johnson, T.R. and Waits, L.P., 2015.** Balancing sample accumulation and DNA degradation rates to optimize noninvasive genetic sampling of sympatric carnivores. Mol. Ecol. Resour. Vol. 15, No. 4, pp: 831-842.

۲۷. **Martínez Gutiérrez, P.G.; Palomares, F. and Fernández, N., 2015.** Predator identification methods in diet studies: uncertain assignment produces biased results? Ecography. Vol. 38, No. 9, pp: 922-929.

۲۸. **Michalski, F.; Valdez, F.P.; Norris, D.; Zieminski, C.; Kashivakura, C.K.; Trinca, C.S.; Smith, H.B.; Vynne, C.; Wasser, S.K.; Metzger, J.P. and Eizirik, E., 2011.** Successful carnivore identification with faecal DNA across a fragmented Amazonian landscape. Mol. Ecol. Resour. Vol. 11, No. 5, pp: 862-871.

۲۹. **Monterroso, P.; Castro, D.; Silva, T.L.; Ferreras, P.; Godinho, R. and Alves, P.C., 2013.** Factors affecting the (in) accuracy of mammalian mesocarnivore scat identification in South-western Europe. J. Zool. (London). Vol. 289, No. 4, pp: 243-250.

۳۰. **Moqanaki, E.M.; Breitenmoser, U.; Kiabi, B.H.; Masoud, M. and Bensch, S., 2013.** Persian leopards in the Iranian Caucasus: a sinking 'source' population? Cat News. No. 59, pp: 22-25.

۳۱. **Morin, D.J.; Higdon, S.D.; Holub, J.L.; Montague, D.M.; Fies, M.L.; Waits, L.P. and Kelly, M.J., 2016.** Bias in carnivore diet analysis resulting from misclassification of predator scats based on field identification. Wildl. Soc. Bull. Vol. 40, No. 4, pp: 669-677.

۳۲. **Naderi, S.; Rezaei, H.R.; Pompanon, F.; Blum, M.G.; Negrini, R.; Naghash, H.R.; Balkız, Ö.; Mashkour, M.; Gaggiotti, O.E.; Ajmone Marsan, P. and Kence, A., 2007.** The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals. PNAS. Vol. 105, No. 46. pp: 17659-17664.

۳۳. **Nowak, C.; Büntjen, M.; Steyer, K. and Frosch, C., 2014.** Testing mitochondrial markers for noninvasive genetic species identification in European mammals. Conserv. Genet. Resour. Vol. 6, No. 1, pp: 41-44.

۳۴. **Prugh, L.R. and Ritland, C.E., 2005.** Molecular testing of observer identification of carnivore feces in the field. Wildl. Soc. Bull. Vol. 33, No. 1, pp: 189-194.

۳۵. **Reed, J.E.; Baker, R.J.; Ballard, W.B. and Kelly, B.T., 2004.** Differentiating Mexican gray wolf and coyote scats using DNA analysis. Wildl. Soc. Bull. Vol. 32, No. 3, pp: 685-692.

۳۶. **Ripple, W.J.; Estes, J.A.; Beschta, R.L.; Wilmers, C.C.; Ritchie, E.G.; Hebblewhite, M.; Berger, J.; Elmhagen, B.; Letnic, M.; Nelson, M.P. and Schmitz, O.J., 2014.** Status and ecological effects of the world's largest carnivores. Science. Vol. 343, No. 6167, 1241484.



www.SID.ir