

אוניברסיטת תל-אביב
הפקולטה למדעי החיים ע"ש ג'ורג' ס. וייז
המדרשה לתארים מתקדמים

**אומדן גודל האוכלוסיה של נמרי ערב (*Panthera pardus nimr*)
בישראל באמצעות אנליזה מולקולרית של DNA מגללים**

**חיבור זה הוגש כעבודת גמר לקראת התואר "מוסמך אוניברסיטה"
במסלול אקולוגיה ואיכות הסביבה באוניברסיטת תל-אביב**

על-ידי

ענבר פרז

העבודה הוכנה במסגרת המחלקה לזואולוגיה של אוניברסיטת תל-אביב

בהנחיית

ד"ר אלי גפן

ד"ר עופר מוקדי

דצמבר 2003

אוניברסיטת תל-אביב
הפקולטה למדעי החיים ע"ש ג'ורג' ס. וייז
המדרשה לתארים מתקדמים

**אומדן גודל האוכלוסיה של נמרי ערב (*Panthera pardus nimr*)
בישראל באמצעות אנליזה מולקולרית של DNA מגללים**

**חיבור זה הוגש כעבודת גמר לקראת התואר "מוסמך אוניברסיטה"
במסלול אקולוגיה ואיכות הסביבה באוניברסיטת תל-אביב**

על-ידי

ענבר פרז

העבודה הוכנה במסגרת המחלקה לזואולוגיה של אוניברסיטת תל-אביב

בהנחיית

ד"ר אלי גפן

חתימת המנחה:

ד"ר עופר מוקדי

חתימת המנחה:

דצמבר 2003

תודות

לשני מנחיי,

דר' אלי גפן, על נסיעות מקסימות למדבר, תמיכה ואכפתיות

דר' עופר מוקדי, על דלת פתוחה, סבלנות אין קץ ומעבדה באווירה נפלאה

לדר' אבי פרבולוצקי, ראש חט' המדע, רשות הטבע והגנים, על תמיכה מוראלית וכלכלית במחקר

לכל חברי ל"מועדון הסלט"- שרון, ורד, תמר, סיגל, ראובן, הגר, רחלי ואסף- על חברות, תובנות

מקצועיות וטיפים לחיים

לרחל פז על שכמעט והצליחה לנטרל את הפחד שלי ממכשפות

ליעל שקד על הקליטה הרכה

לדרור הבלנה שתתן מזמנו ומנסיונו בסיוורים במדבר

לדר' שריג גפני על התמיכה ועל יחסי השכנות הטובים

ללי ולאבי על חברות, עזרה ואירוחים לבביים בעין גדי

לפקחי שמורת עין גדי ולמיכאל בלכר, ביולוג השמורה, על ההתעניינות ושיתוף הפעולה

לערן, מנהל ביס"ש שדה בוקר על שיתוף פעולה יוצא דופן

לענבל, ביס"ש עין גדי על איסופים ודיווחים

למיכל על תרומתו של הפרויקט שבצעה

לפקחי רשות הטבע והגנים: יורם, אילן, ידיד, שחר, עזרא, דני, אביים ואלי- על עזרה בשטח ודיווחים

מזדמנים

לאלופי ה-GIS ברשות הטבע והגנים: יונת, שמוליק ובמיוחד למיכל, על ספיגת טרטורים ואכפתיות

לחטיבת המדע של רשות הטבע והגנים: בני, שקדי, לינדה ובעיקר לסיימון

לנועה על תמיכה והכנסה לפרופורציות

לנוגה על הרבה מצב רוח טוב והזדהות

לצילה מהמוזיאון הזואולוגי

לדר' צחי פלג ולסאלם בגן החיות הלימודי בחיפה

לדר' אמליה טרקל בספארי ר"ג

לדר' נתניאל וואלייר

למשפחה המורחבת, שכל אחד בה תרם לעבודה בדרכו שלו

ולמודי שלי, על יותר מדי דברים מכדי לפרט

תקציר

אוכלוסיית הנמרים המתקיימת באזור מדבר יהודה והר הנגב משתייכת לתת מין (*Panthera pardus nimr*) המצוי תחת איום של הכחדה. תפוצתו של תת המין אינה רציפה והיא כוללת את עומאן, ערב הסעודית, איחוד האמירויות, תימן וישראל ומוערך כי נותרו בטבע כ-100 פרטים בלבד. קיטוע הרצף שבין האוכלוסיות השונות של תת המין הינו תוצאה של שינויים שמחולל האדם בנוף הטבעי, דוגמת בירוא יערות ושימוש בשטחים גדלים והולכים לצורכי יישוב וחקלאות. לאור העובדה כי נמרים הם בעלי חיים יחידאיים המתקיימים בצפיפות אוכלוסין נמוכה במיוחד, קיטוע זה של בתי הגידול גורם לבידודן של תת אוכלוסיות קטנות. בהעדר מעבר גנים (gene-flow) על ידי פרטים מהגרים נתונות תת האוכלוסיות לסחיפה גנטית, זיווגי שארים ולהשפעותיהם השליליות (inbreeding depression), שלאורך זמן עשויות להביא אוכלוסיות אל סף ההכחדה. באיחוד האמירויות ובעומאן מושקעים כיום מאמצים רבים על מנת למנוע את הכחדתו של תת המין בחצי האי ערב. בשני גרעיני רבייה שהוקמו באזור מוחזקים נמרים שנלכדו בטבע במטרה להשיב בעתיד פרטים אל הבר.

אוכלוסיית הנמרים של מדבר יהודה נחקרה על ידי גיורא אילני במהלך שנות ה-70 וה-80 ואילו אוכלוסיית הר הנגב לא נחקרה מעולם. כיום אין כל מידע לגבי מצב האוכלוסיה בארץ, פרט לדיווחים מזדמנים על תצפיות בנמרים. מטרת המחקר הנוכחי היתה לאמוד את גודל אוכלוסיית הנמרים במדבר יהודה והר הנגב. אומדן זה יכול להוות בסיס בתכנון של מחקרים נוספים ובייסוד עתידי של תכנית לצורך שיקום האוכלוסיה ומניעת הכחדה מקומית של תת המין.

במשך כשנתיים נערך דיגום שיטתי של גללי נמרים לאורך ערוצים מרכזיים המשמשים נמרים ברחבי מדבר יהודה והר הנגב. גללים אלו שימשו לצורך הפקת DNA, עליו יושמו אנליזות מולקולריות שונות ברמת המין, האוכלוסיה והפרט. היתרון שבשיטת הדיגום הלא-פולשנית (non-invasive) הוא בכך שאינה דורשת את נוכחות בעל החיים בעת הדיגום ובכך נמנעת הפרעה למושא המחקר ומתאפשרת השגה של מספר רחב של דגימות. לצורך זיהוי אינדיווידואלי נעשה שימוש בסדרה של סמנים מיקרוסטיליטיים- רצפי DNA הכוללים מספר משתנה של חזרות על אלמנטים קצרים (2-6 נוקלאוטידים)- המציגים שיעור גבוה של פולימורפיזם ביונקים. שימוש במספר אתרי מיקרוסטיליטים מאפשר בניית פרופיל רב-אתרי שמהווה "טביעת אצבע גנטית" ייחודית של פרטים שונים באוכלוסיה. כושרם של האתרים המיקרוסטיליטיים להבדיל בין פרטים שונים באוכלוסיה נבחן באמצעות מעריך סטטיסטי שנקרא Probability of identity. מדד זה עושה שימוש בנתונים של תדירויות אללים באתרי המיקרוסטיליטים ובוחן את ההסתברות לכך ששני פרטים שנדגמו באקראי מן האוכלוסיה יציגו גנוטיפ רב-אתרי זהה.

תוצאות אנליזת המיקרוסטליטיים שימשו לצורך הערכת גודל האוכלוסיה באמצעות שיטת ה-Rarefaction curve. בהנחה שכל גנוטיפ ייחודי מייצג נמר שונה, הוערך גודל האוכלוסיה כאסימפטוטה של עקומה המתארת את מספרם המצטבר של גנוטיפים ייחודיים כפונקציה של מספר הגללים שנבחנו. בנוסף, זוהה זיווג הנמר באמצעות PCR וטכניקת היברידיזציה (DNA dot-blotting) תוך שימוש בסמנים ספציפיים לשני כרומוזומי המין.

במהלך המחקר הושגו 54 דגימות DNA של נמרים מאתרים שונים בשטח המחקר. שילוב של תוצאות האנליזות המולקולריות עם מידע לגבי פיזורם המרחבי של האתרים בהם נמצאו הגללים הראה כי הדגימות מייצגות לפחות שמונה נמרים שונים: זכר ונקבה במדבר יהודה ושתי נקבות וארבעה זכרים באזור הערבה והר הנגב. השונות הגנטית שהוצגה בין הפרטים השונים היתה נמוכה מאוד ובאתרים רבים הוצג מונומורפיזם המרמז על זיווגי שארים וסחיפה גנטית האופייניים לאוכלוסיות קטנות. שלושה פרטים הציגו זהות גנוטיפית מוחלטת ל-11 אתרים מיקרוסטליטיים וניתן היה להבדיל ביניהם רק על סמך הפיזור הגיאוגרפי והאנליזה לקביעת הזיווג. אומדן גודל האוכלוסיה בגישה הסטטיסטית מצביע על קיומם של תשעה גנוטיפים רב-אתריים ייחודיים באוכלוסיה לכל היותר.

מחקר זה מספק את האומדן הראשון לגודל אוכלוסיית הנמרים בישראל, בהסתמך על נתונים גנטיים. על אף שנמרים כלל לא נצפו לכל אורך תקופת המחקר, גלליהם ספקו תשובות לשאלות שלרוב ניתן לענות עליהן רק באמצעות תצפיות או מגע ישיר עם בעל החיים. לאור השונות הגנטית הנמוכה שהוצגה בקרב הפרטים השונים נראה כי ללא התערבות חיצונית לצורך "העשרה גנטית" והגנה על השטחים המאוכלסים על ידי נמרים, סיכויי האוכלוסיה לשרוד לאורך זמן אינם גבוהים. עם זאת, ממצאי מחקר זה מעידים על הימצאם של 3 נקבות ו-5 זכרים לפחות, ומשאירים מקום לתקווה כי האוכלוסיה מסוגלת להתרבות.

תוכן העניינים

1	1. מבוא
1	1.1 דעיכת טורפים גלובאלית
3	1.2 הנמר (<i>Panthera pardus</i>) - ביולוגיה ואקולוגיה
5	1.3 נמרי ישראל- עבר והווה
7	1.3.1 אוכלוסיית הנמרים במדבר יהודה והר הנגב
8	1.3.2 דיגום לא-פולשני לצורך הערכת גודל האוכלוסיה וממשק עתידי
10	2. מטרות המחקר
11	3. שיטות העבודה
11	3.1 עבודת השטח
11	3.1.1 אתרי הדיגום
11	3.1.2 איסוף הגללים
11	3.2 עבודת המעבדה
12	3.2.1 הפקת DNA
13	3.2.2 זיהוי מין הטורף ממנו הופק DNA
15	3.2.3 בחינת השונות הגנטית באוכלוסיה וזיהוי אינדיווידואלי של פרטים
17	3.2.4 בדיקת זכריות
19	3.3 אומדן גודל אוכלוסיית הנמרים בבר
20	4. מהלך העבודה ותוצאותיה
20	4.1 ניסוי מקדים עם גללי טורפים מחי-בר יטבתה
21	4.2 ממצאי גללים בשטח המחקר
23	4.3 זיהוי אינדיווידואלי
23	4.3.1 סמנים מיקרוסטליטיים
29	4.3.2 MHC-SSCP
30	4.4 מבחן זכריות
34	4.5 הערכת גודל האוכלוסיה בבר

37	 5. דיון
37	 5.1 מגבלות הדיגום הלא-פולשני והשלכותיהן על תוצאות המחקר
39	 5.2 זיהוי אינדיווידואלי
39	 5.2.1 נמרי מוזיאון- ביקורת לכושר ההפרדה בין פרטים
40	 5.2.2 נמרי הבר
42	 5.2.3 זווים של הנמרים ופיזורם הגיאוגרפי - הגדלת כושר ההפרדה בין פרטים
45	 5.3 אומדן גודל האוכלוסיה בבר
49	 5.4 השלכות לעתיד
50	 5.5 סיכום
52	 6. רשימת ספרות
62	 7. נספח

רשימת טבלאות ואיורים

טבלאות

- 23 **טבלה 1-** תוצאות אנליזת אתרי מיקרוסטליטים בקרב נמרי החי-בר
- 25 **טבלה 2-** תוצאות אנליזת אתרים מיקרוסטליטיים בהפקות DNA מעורות נמרים (*P.p. nimr*)
- 28 **טבלה 3-** חלוקת דגימות DNA מאוכלוסיית הבר לגנוטיפים רב-אתריים
- 34 **טבלה 4-** תוצאות האומדן לגודל אוכלוסיית נמרי הבר באמצעות Rarefaction-curve
- 44 **טבלה 5-** שילוב של תוצאות החלוקה לגנוטיפים ייחודיים, זיהוי הזויג והפיזור הגיאוגרפי
- 47 **טבלה 6-** תוצאות מבחן PI, ו-PI(sibs) לאתרים מיקרוסטליטיים

איורים

- 6 **איור 1-** מפת התפוצה של נמרי ערב (*P.p. nimr*)
- 22 **איור 2-** אתרים בהם נמצאו גללי נמרים, בהשוואה לאתרים בהם נצפו נמרים ב-10 השנים האחרונות
- 25 **איור 3-** דגמי האללים באתר Fca391 בנמרות מוזיאון
- 27 **איור 4-** הופעתם של bands-shadow באתרי מיקרוסטליטים דינוקלאוטידיים
- 27 **איור 5-** הומוזיגוטים כוזבים בתוצאות סריקת האתר המיקרוסטליטי F115
- 29 **איור 6-** איזור השונות ברצף האללים של פרט הטרוזיגוט לאתר Fca453
- 29 **איור 7-** איזור השונות ברצף האללים של פרט הטרוזיגוט לאתר F115
- 30 **איור 8-** דגמי האללים לזוג הפריימרים DRB219 ו-DRB61A בטכניקת SSCP
- 32 **איור 9-** התאמת ספציפיות הפריימר $\delta ZfyF$ לרצף הגן Zfy בנמרים
- 36 **איור 10-** אומדן גודל האוכלוסייה של נמרי הבר באמצעות אנליזת Rarefaction, תוך שימוש
- 46 במשוואת Holdridge (A) ו-Chessel (B)
- **איור 11-** פיזור הגיאוגרפי של הנמרים בהתאם לחלוקה לגנוטיפים ומבחן הזויג

1. מבוא

1.1 דעיכת טורפים גלובאלית

לטורפי-על תפקיד חשוב בשמירה על יציבותן ושלמותן של מערכות אקולוגיות (Murray *et al.*, 1999) ובהיעלם עלולה להתרחש שרשרת של שינויים טרופיים, שתשפיע על מבנה החברות האקולוגיות (Wilcox & Murphy, 1985; Crooks & Soule, 1999). במהלך המאות האחרונות חלה ירידה דרמטית במספרם ובתפוצתם של מיני טורפים רבים בעולם (Reading & Clark reviewed in Gittleman, 1996). הכחדה של אוכלוסיות יכולה להתרחש כתוצאה מגורמים דמוגרפיים, סביבתיים, גנטיים או קטסטרופות טבעיות, אולם גורמים אנתרופוגניים מהווים כיום את האיום הגדול ביותר על אוכלוסיות הטורפים (Shaffer, 1981; Crooks, 2002). על אף שהחשיבות בשימור אוכלוסיות בר של טורפים גדולים זכתה להכרה ברחבי העולם, פעילויות רבות של האדם מצויות בקונפליקט עם שימורם של מינים רבים של טורפים גדולים (Salvatori *et al.*, 2002).

ההשפעה האנתרופוגנית החמורה ביותר בימינו נובעת משינויים שמחולל האדם בנוף הטבעי, כדוגמת בירוא יערות, סלילת כבישים ושימוש בשטחים גדלים והולכים לצורכי יישוב וחקלאות. הרס וקיטוע (fragmentation) של בתי גידול טבעיים נחשב לאיום הגדול ביותר המרחף על המגוון הביולוגי ומהווה את הגורם הראשוני למשבר ההכחדות הנוכחי (Wilcox & Murphy, 1985; Crooks, 2000). אבדן של שטחי מחיה מהווה איום חמור במיוחד עבור טורפים גדולים, אשר מתקיימים לרוב בצפיפויות אוכלוסין נמוכות (Primm & Clark, 1996) וזקוקים לשטחים נרחבים על מנת להגיע לגודל אוכלוסיה יציב.

קיטוע של בתי גידול גורם לבידודן של תת אוכלוסיות (Bender, 1998; Schwartz *et al.*, 1998) ועשוי להוביל להכחדתן, בייחוד אם הן אינן מקושרות על ידי מסדרונות מעבר (Crooks, 2002). העדר מקורות פוטנציאליים של מהגרים מוביל לסחיפה גנטית ולזיווגי שארים אינטנסיביים כפועל יוצא של גודל אוכלוסיה קטן וסופי (Frankham, 1998) וכתוצאה מכך נתונות האוכלוסיות המבודדות לאובדן של שונות גנטית. ההשפעות השליליות של זיווגי שארים (inbreeding depression) באות לידי ביטוי בעליה ברגישות האוכלוסיה למחלות זיהומיות ובירידה בהצלחה הרבייתית המתבטאת בשיעורי תמותה גבוהים בקרב הצאצאים, ירידה בגודל השגר וחוסר פוריות (O'Brien, 1994; Frankham, 1998). Lerner (1954) מתאר את היתרון הסלקטיבי של הטרוזיגוטיות באדפטציה של אוכלוסיות. הטרוזיגוטיות מקנה כושר הסתגלות לשינויים סביבתיים ("buffering capacity").

שימור וממשק

הצעד הראשון בו יש לנקוט על מנת להבטיח את עתידן של אוכלוסיות הטורפים בטבע הינו הגנה על בתי הגידול הטבעיים אותם הם מאכלסים. אולם, אפילו בתוך אזורים מוגנים קיימת סכנת ההכחדה בשל סחיפה המביאה לאבדן השונות הגנטית באוכלוסיה בשל הגבלת תחלופה גנטית (genetic flow) נמוכה או חסרה. תוצאות מחקרם של Woodroffe & Ginsberg (1998) מראות כי טורפים המשוטטים על פני מרחקים גדולים נתקלים באורח תדיר באדם ובפעילותו בגבולות של שמורות טבע, עובדה שמהווה את גורם התמותה העיקרי בקרב פרטים בוגרים.

באזורים בהם חלה הידרדרות משמעותית בגודל האוכלוסיה לא די בהגנה על שטח המחיה ותידורש העברה של פרטים (טרנסלוקציה) ממקור אחר. טרנסלוקציה מוגדרת כהעברה ושחרור של בעלי חיים לטבע למטרת יסוד אוכלוסיה חדשה, השבה של אוכלוסיה שהושמדה או הרחבת אוכלוסיה קטנה המצויה במצב קריטי (Griffith *et al.*, 1989). אוכלוסיות רבות של מינים שבעבר היו בעלי תפוצה רציפה ללא מחסומים למעבר גנים הפכו מקוטעות על ידי פועלו של האדם, כך שטרנסלוקציה של פרטים מבין הקבוצות המקוטעות יכולה ליצור מעבר גנים שאינו שונה בהרבה מזה שקדם להשפעת האדם (Hedrick, 1995). בהעדר מקורות מהם ניתן להעביר פרטים או במצב בו הוכחדה האוכלוסיה, עולה הצורך בשחרור פרטים מגרעיני רבייה בשבי (Seddon & Soorae, 1999). עם זאת, לרוב מידרדר מצבן של אוכלוסיות בשבי בשל inbreeding depression, אבדן שונות גנטית, הצטברות של מוטציות מזיקות והסתגלות לתנאי השבי אשר הופכת הרסנית עם ההשבה לבר (Woodworth *et al.*, 2002). טרנסלוקציה תוגדר כמוצלחת כאשר כתוצאה ממנה תיווסד אוכלוסיה שמתקיימת בזכות עצמה, שאינה דורשת התערבות חיצונית. Griffith *et al.* (1989) סיכמו בעבודתם 81 מקרים של טרנסלוקציות והראו כי אחוזי ההצלחה של השבות מן השבי הם כ-38%, אולם עבור טורפים גדולים הם נמוכים הרבה יותר.

תכניות השבה דורשות תכנון קפדני ובקרה ארוכת טווח ולרוב עלותן גבוהה מאוד. על מנת לעצב תכנית שימור לשיקום מין חשוב לאמוד תחילה את גודל האוכלוסיה. הערכת גודל אוכלוסיה של מינים נדירים או חמקניים לרוב בעייתית בשל גודל מדגם קטן (Mills *et al.*, 2000). במקרים בהם קיים קושי באיתור הפרטים, שיטות מחקר הדורשות לכידה וניוד של בעל החיים אינן ישימות בשל בעיות אתיות ולוגיסטיות (Palomares *et al.*, 2002). יתר על כן, מחקרים הנסמכים על דיגום אופורטוניסטי (mark and recapture, transect) עשויים לסבול מהטיה כתלות במידת הקושי לצפות או ללכוד פרטים. צפיפות האוכלוסיה הנמוכה ואורח חייהם החמקני של טורפים הופכים מגבלות אלו לאקוטיות, בייחוד כאשר מצוי המין תחת איום של

הכחדה. שיטות מחקר לא-פולשניות (non-invasive) שאינן דורשות לכידה, סימון או הפרעה לבעל החיים, מהוות פתרון לבעיה המתוארת ומיושמות בעבודה זו.

1.2 הנמר (*Panthera pardus*) - ביולוגיה ואקולוגיה

הנמר (*Panthera pardus*) הינו טורף יחידאי המשתיך לסוג *Panthera*, שהתפתח ברדיאציה המאוחרת ביותר של משפחת החתוליים, לפני כ-2 מיליון שנה. הסוג כולל חמישה חתוליים גדולים נוספים: היגואר (*Panthera onca*); האריה (*Panthera leo*); הטיגריס (*Panthera tigris*) ואת נמר השלג (*Panthera uncia*) (Janczewski et al., 1995).

לנמרים תפוצה גיאוגרפית רחבה במיוחד. הודות לסתגלותם יוצאת הדופן מתקיימים נמרים במגוון רחב של נופים ואקלימים החל ביערות גשם דרך סוואנות ועד למדבר. באפריקה לדוגמא, מאכלס הנמר את כל סוגי שטחי המחיה, להוציא את המדבריות המובהקים ואת המקומות שבהם הושמד על ידי האדם (Myers, 1976; Martin & Meulenaer, 1988). השונות הפנוטיפית הגבוהה בין אזורי התפוצה הביאה להגדרתם של עשרים ושבעה תתי מין בשלבים המוקדמים של הטיפול הטקסונומי במין. Miththapala et al. (1996) בחנו מחדש את שיוכם של נמרים לתתי המין השונים בהסתמך על מדדים מורפולוגיים וטכניקות מולקולריות: אלוזימים, חיתוך רסטרקציה של DNA מיטוכונדריאלי ומיניסטליטים. התוצאות הובילו לחלוקה מחודשת של המין לשמונה תתי מין בהתאם לאזורי התפוצה הבאים: (1) *P.p. pardus*, אפריקה; (2) *P.p. saxicolor*, מרכז אסיה; (3) *P.p. fusca*, הודו; (4) *P.p. kotiya*, סרי לנקה; (5) *P.p. melas*, ג'אווה; (6) *P.p. orientalis*, מזרח רוסיה; (7) *P.p. japonensis*, צפון סין ו- (8) *P.p. delacouri*, דרום סין. Uphyrkina et al. (2001) בעבודתם תומכים בחלוקה זו בהסתמך על רצפים של DNA מיטוכונדריאלי (mtDNA), אולם מתארים תת מין תשיעי *P.p. nimr* בחצי האי ערב, שנכלל בחלוקה הקודמת תחת תת המין *P.p. saxicolor*. במשך המאות האחרונות קטן מספרם של הנמרים כמו גם תפוצתם באופן משמעותי במקביל להתפשטות האוכלוסיה האנושית. הביקוש הגדול לפרוות בשנות ה-60 של המאה הקודמת הוביל לצייד נמרים אינטנסיבי באפריקה ובאסיה, בסדר גודל של כ-50,000 פרטים בשנה (Myers, 1976). במהלך שנות ה-70 הופחת במידה ניכרת הסחר בעורות נמרים בעקבות הכללת הנמר תחת נספח I (Appendix I) של האמנה הבינלאומית לסחר במיני בעלי חיים וצמחים בסכנת הכחדה (CITES). כיום עומד הנמר תחת איום בכל אזורי תפוצתו הגיאוגרפית למעט באפריקה המרכזית ובהודו, בעיקר בשל אבדן שטחי מחיה, קיטוע של בתי גידול ובידודן של תת אוכלוסיות קטנות. ככל שהאוכלוסיה המבודדת קטנה יותר, כך גדולים סיכוייה

להיכחד (Shaffer, 1981). בעיה זו קריטית לאור צפיפות האוכלוסיה הנמוכה בה מתקיימים נמרים, אורח חייהם היחידאי וקצב ההתרבות האיטי שלהם.

נמרים בוגרים מתקיימים בצפיפות אוכלוסיה נמוכה ביותר ובאים במגע עם בני מינם אך ורק לצורך רביה (Spong *et al.*, 2000). האזורים המאוכלסים על ידי נמרים מחולקים לשטחי משכן (home range) המשתרעים על מאות קילומטרים רבועים. שטח משכן מוגדר כאזור אותו חוצה הפרט בזמן פעילותו השגרתית של איסוף מזון, רביה וטיפול בצאצאים (Burt, 1943 reviewed in Mizutani & Jewell, 1998). שטח המשכן של זכרים גדול מאוד וחופף עם שטחי משכן של 2-3 נקבות בממוצע. Mizutani & Jewell (1998) שחקרו את פיזורם המרחבי של נמרים בקניה, מצאו שתתכן גם חפיפה בין שטחי משכן של פרטים בני אותו הזוג. בנקבות מתקיימת לעיתים חפיפה בין שטח משכן של האם לזה של צאצאיה עד אשר הם מתבססים במקום אחר. בזכרים החפיפה נדירה יותר ולרוב תתקיים רק באזורים שאינם מהווים מרכזי פעילות חשובים.

נמרים מגיעים לבגרות מינית בגיל שלוש שנים. בתקופת החיזור משוטט הנמר הזכר על פני שטחים נרחבים ותר אחר סימנים המעידים על מצבן הרבייתי של הנקבות באזור. סימון באמצעות ריחנים (פרומונים), המתבצע על ידי שני הזוויגים, מהווה את אמצעי התקשורת העיקרי והוא נעשה על ידי התזת שתן והטלה של גללים במקומות בולטים או בגומות רדודות שנחפרות בקרקע (Bailey, 1993). הסימון משמש בנוסף להגדרת גבולות שטחי המשכן וכך נמנעים מפגשים בלתי רצויים בין פרטים שונים.

משך ההריון של נמרה הוא כשלושה חודשים. שגר ממוצע מכיל 1-2 גורים (Cunningham & Gross, 2000), אולם תצפיות מהארץ ומהעולם מצביעות על כך שבמקרים רבים שורד רק גור אחד. הטיפול בגורים נמשך בין שנה לשנתיים במהלכן אין הנקבה נכנסת להריון נוסף. תוחלת החיים של נמר בטבע הינה 12-15 שנה (Turnbull, 1967; תמנה, 2000) ובשבי יכול נמר להגיע לגיל 21 (Crandall, 1964).

אורח חייו היחידאי של הנמר מוכתב בעיקר על ידי שיטת הצייד ומאפייני הטרף שלו. טורפים אשר צדים טרף שקטן מגודלם מסוגלים לרוב להכניע אותו בגפם ולצרוך אותו בשלמותו במהירות (Sandell reviewed in Gittleman, 1989). נמרים צדים בשיטה של התגנבות ומארב (Karanth & stalk-and-ambush hunter; Sunquist, 2000) ולפיכך מתקיימים באזורים סגורים המספקים שפע של מקומות מסתור, כמו סבך צמחיה או שטח מבוזר. נמרים לרוב נחים בשעות האור ונעים ברציפות במשך הלילה (Mizutani & Jewell, 1998) בחיפוש פעיל אחר טרף. הם צדים בעדיפות פרסתניים (Spong *et al.* 2000) ועם זאת מציגים גמישות גדולה במין ובגודל הטרף. באזורים בהם חיים נמרים בסמיכות לשטחים מיושבים, הם נוטים לטרוף גם חיות בית ומשק, תכונה שמעמידה אותם בקונפליקט עם אינטרסים של האדם.

1.3 נמרי ישראל- עבר והווה

הנמר הוא הגדול בין בני משפחת החתוליים בארץ (מנדלסון ויום-טוב, 1987). על פי כתבי Tristram מאמצע המאה ה-19 תפוצתו של הנמר באזור הארץ כללה את ים המלח, הגלעד, הבשן ואזורים מיוערים במערב ישראל (רשות שמורות הטבע, 1979) אולם תפוצתו בהווה מוגבלת ביותר. בהסתמך על מאפיינים פנוטיפיים מתאר Mendelssohn (1989) שלושה תתי מין באזור הארץ וסיני: *P.p. tulliana* בגליל ובגולן, *P.p. nimr* במדבר יהודה והנגב ו- *P.p. jarvisi* בחצי האי סיני.

P.p. tulliana הינו הגדול שבשלושת תתי המין. תפוצתו בעבר כללה את הגליל ונמשכה עד לדרומה של טורקיה. על פי נתוני IUCN (2003), יתכן כי בדרום מערב טורקיה נותרה אוכלוסיה קטנה מאוד ומקוטעת, אולם על פי Shoemaker (1990) נראה כי הושמדה כליל. בארץ היה תת המין נפוץ עד לשנות ה-30, אולם בהעדר שמירת טבע ניצודו פרטים רבים (Mendelssohn, 1990). כיום מתקבלים מעת לעת דיווחים על תצפית בנמר באזור הגולן והגליל העליון, אולם לא נראה כי מתקיימת בארץ אוכלוסיה קבועה של תת המין. Hardy העלה כבר בשנות ה-40 את הסברה כי נמרי הצפון אינם חיים דרך קבע בגליל, אלא מגיעים מדי פעם מאזור החרמון והר הלבנון (רשות שמורות הטבע, 1979). בסוריה ובלבנון שמירת הטבע אינה יעילה ולפיכך נראה כי הסיכויים להמשכיות של תת המין באזור קטנים.

תפוצתו של תת המין *P.p. jarvisi* כללה את מערב אלכסנדריה והרי דרום סיני (Flower, 1932 מצוטט על ידי רשות שמורות הטבע, 1979) אולם מנתוני IUCN (2003) נראה כי נכחד. הדיווח האחרון לגבי תצפית בפרט מתת מין זה התקבל באמצע שנות ה-60 (טבע וארץ, 1976). עדות נוספת שמהימנותה מוטלת בספק היא של עקבות שנצפו בשנת 1998 (רשות שמורות הטבע, 1999).

P.p. nimr הינו מתתי המין הקטנים בעולם. יתכן כי תת מין זה אינו שונה מתת המין שתואר מסיני (Pocock, 1932; Harrison, 1991; Shoemaker, 1993), אולם מאחר והאחרון נכחד האפשרות לבחון זאת מצומצמת עקב תיעוד דל בספרות ובאוספים. תפוצתו של תת המין כוללת את עומאן, ערב הסעודית, איחוד האמירויות, תימן וישראל (Nader, 1996) (איור 1). יתכן כי נותרו מספר פרטים של תת המין גם בירדן, בעברו המזרחי של ים המלח (Qumsiyen et al., 1993). מוערך כי מספר הפרטים הכולל בחצי האי ערב קטן מ-100 (Hellyer, 1993 reviewed in Cunningham & Gross, 2000). האוכלוסיות בדרום מערב אסיה מונות פחות מ-50 פרטים כל אחת והן מבודדות מאלו שבחצי האי ערב (IUCN, 2003). בהשוואת רצפי DNA מיטוכונדריאלי של פרטים מתתי מין שונים נמצאו אתרים דיאגנוסטיים רבים המבדילים את תת מין זה מכל תת מין אחר, כתוצאה מבידוד ממושך (Uphyrkina et al., 2001). בארץ מתקיימות כיום שתי תת אוכלוסיות של תת המין, האחת במדבר יהודה מנחל אוג בצפון ועד נחל צפית בדרום, והשניה באזור הר

הנגב משדה בוקר בצפון ועד נחל ברק בדרום. נראה כי בעבר התקיימה אוכלוסיית הנמרים כאוכלוסייה רציפה אחת (רייכמן ושלמון, 1992) אולם כיום העדויות לפעילות נמרים באזורי המעבר שבין שתי תת האוכלוסיות מועטות (רייכמן, 1993).



איור 1- מפת התפוצה של נמרי ערב (P.p. nimr) (Harrison, 1991; Nader, 1996). בדומה לתפוצתם בישראל מאכלסים הנמרים בחצי האי ערב את אזורי המדבר המבותרים.

1.3.1 אוכלוסיית הנמרים במדבר יהודה והר הנגב

במדבר יהודה והר הנגב מתקיימים נמרים באזורים מבותרים כדוגמת ערוצים מצוקיים, המאופיינים בעושר במזון ובמחסות המשמשים לצורכי לינה או מארב לטרף. כפי שארע בסיני, גם באזורים אלו לחץ רעייה וצייד בידי בדואים פגע באוכלוסיית הנמרים כמו גם בטרפם. לאחר שבשנת 1967 החלה שמירת טבע מוגברת באזור, הסתמנה מגמת התאוששות של הצומח והחי ובכללה של נמרים (Mendelssohn, 1989).

באמצע שנות ה-70 החל להתנהל מחקר אודות נמרי מדבר יהודה מטעם רשות שמורות הטבע, בראשותו של גיורא אילני. בתקופת המחקר, שארך כ-15 שנים, נערך מעקב אחר פעילותם של 7 נמרים ממושדרים בפרקי זמן שונים (אייל, 1990). עד לאותה העת היה המידע אודות תת המין (P.p. nimr) דל ביותר, שכן

מרבית המחקרים אודות נמרים עסקו באוכלוסיות מאפריקה והמזרח הרחוק, המשתייכות לתתי מין אחרים ונפוצים יותר. אלון רייכמן (1993) שהיה שותף למחקר זה מעריך כי בתקופה זו התקיימו 8-10 פרטים בוגרים. בשמורת עין גדי, המשתרעת על שטח של כ-40 קמ"ר, נצפו לעיתים שלושה נמרים בו זמנית. בשמורה מתקיימות אוכלוסיות של יעלים, שפני סלע ודורבנים המהווים את עיקר התפריט של תת המין. באזורים בהם מרוכזים משאבים חיוניים כדוגמת צפיפות גבוהה של טרף תיתכן חפיפה בין שטחי מחיה של מספר נמרים (Mizutani & Jewell, 1998).

בעשורים האחרונים תועדו מקרים רבים של מוות של נמרים בהשפעת האדם. בין השנים 1964-1993 מוכרים 3 מקרי ירי, 3 מקרי הרעלה ו-2 מקרים של דריסה- אובדן של 4 נקבות, 2 זכרים ו-2 גורים. בנוסף, בשנת 1979 נלכדו שתי נקבות מעין גדי על ידי רשות שמורות הטבע, משום שנהגו לצוד חיות מחמד מקיבוץ עין גדי. היעלמן של 6 נקבות בטווח של פחות מ-30 שנה גרם לפגיעה קשה באוכלוסיית מדבר יהודה ומאז ירד באופן חד מספר התצפיות בנמרים באזור. הממצאים האחרונים אשר יכולים להעיד על הימצאם של נמרים באזור יוחסו כולם לזכר מסוים אחד (חריתון), צאצאה האחרון של הנמרה המפורסמת שלומציון, שנולד בשנת 1991. הסברה הרווחת כיום היא כי לא נותרו נקבות באזור מדבר יהודה.

השטח המאוכלס על ידי נמרים באזור הר הנגב רחב מזה של מדבר יהודה וחלקים נרחבים ממנו משמשים שטחי אש של צה"ל. גורמים אלו הביאו לכך שמעולם לא נערך מחקר ארוך טווח אודות אוכלוסיית הנמרים בהר הנגב. מסקר שנערך על ידי רשות שמורות הטבע והחברה להגנת הטבע בשנת 1997 עלה כי בהר הנגב מתקיימים לפחות שבעה נמרים, שעדויות לנוכחותם של ארבעה מהם נמצאו בנחל חווה. מספר מקורות המים בהר הנגב מצומצם ולכן סביר כי נחל חווה, בדומה לעין גדי, מהווה אתר פעילות מרכזי בו מתקיימת חפיפה בין שטחי מחיה של מספר נמרים, בשל זמינות המזון ומקורות המים.

1.3.2 דיגום לא-פולשני לצורך הערכת גודל האוכלוסיה וממשק עתידי

השטחים המבוותרים המוגנים במדבר יהודה והר הנגב משתרעים על כ-2500 קמ"ר. בהתחשב בשטחי המשכן הגדולים בהם מחזיקים נמרים, בממוצע 84 קמ"ר בנקבות ו-137 קמ"ר בזכרים, במדבר יהודה והר הנגב יכולים להתקיים לכל היותר 25 פרטים (Ilani, 1990). גורם נוסף המגביל את גודל אוכלוסיית הנמרים הינו גודלן של אוכלוסיות היעלים, המהווים את עיקר תפריטו של הנמר. שכיחות הטרף משפיעה במידה רבה על גודל שטחי המשכן של נמרים וכן על פעילותו (Mizutani & Jewell, 1998). מוערך כי במדבר יהודה מתקיימת אוכלוסיה המונה כ-500 פרטים ואוכלוסיה נוספת של כ-300 פרטים בהר הנגב (רשות הטבע והגנים, 2002).

על מנת שיוכלו אוכלוסיות קטנות להתקיים לאורך זמן חייבת להישמר שונות גנטית. במידה ומתקיימות אוכלוסיות שרידיות של נמרים מחוץ לתחומי הארץ, הגידור הכבד בגבולות ישראל עם ירדן ומצרים (Shkedy & Saltz, 2000) אינו מונע מעבר של פרטים, אולם פוגע ברצף של בית הגידול. בהעדר הגירה של פרטים בין תת אוכלוסיית הנגב לזו של מדבר יהודה או ממדינות שכנות, נוצר בידוד גנטי של תת האוכלוסיות והן חשופות לזיווגי שארים ולהשפעותיהם השליליות. אפילו בתקופת מחקרו של Ilani (1990) כשמספר הנמרים במדבר יהודה היה ככל הנראה גבוה מהיום, נצפו שלושה מקרים בהם הזדווגה נקבה עם צאצא שלה.

על מנת לנקוט בצעדים להגנת אוכלוסיית הנמרים בארץ ישנו צורך מיידי בקביעת אומדן מדויק של גודל האוכלוסייה. איתור מוקדם של ירידה בגודל האוכלוסייה חיוני לצורכי שימור, משום שיישום של פעולות ממשק יוכל במקרים רבים למנוע את הכחדתה (Schwartz *et al.*, 1998). היות ונמרים מתקיימים בצפיפויות אוכלוסייה נמוכות מאוד, כמעט שבלתי אפשרי לתזמן מפגש עימם. לאור העובדה שאוכלוסיית הנמרים בארץ מצויה תחת איום של הכחדה, שכיחות הפרטים בטבע נמוכה עוד יותר. מכאן שאומדן גודל האוכלוסייה לא יכול להתבסס על טכניקה המערבת לכידה של פרטים (mark & recapture), בייחוד בהתחשב בגודל המדגם הרחב הדרוש לצורך אומדן מדויק. לכידות עשויות לסכן את בעל החיים ואף לגרום להטיה בתוצאות המחקר כתוצאה מהתנהגות בעל החיים ותגובתו ללכידה (Schwartz *et al.*, 1998). בנוסף, העלות הגבוהה ומספר ההיתרים הגדול הנחוצים לצורך לכידה וניוד של דגימות מקשים מאוד על המחקר אודות מינים בסכנה (Kohn & Wayne, 1997).

ניתן לעקוף בעיות אלו באמצעות טכניקות דיגום לא פולשניות. דיגום זה אינו דורש מגע בין החוקר למושא המחקר ובאמצעותו ניתן להגיע לגודל מדגם רחב המתבסס על דגימות DNA. בשיטת דיגום זו נמנע מצב שבו בעל חיים מאבד את תג הסימון, שכן זיהוי הפרט נעשה באמצעות "תיוג-מולקולרי". דיגום לא פולשני מוגבל למצבים בהם בעל החיים מותיר אחריו את המקור ממנו ניתן להפיק DNA כדוגמת גללים, שתן, שיער, נוצות ורוק (Taberlet *et al.*, 1999).

איסוף גללים תוך סריקת שטחים נרחבים מהווה דרך יעילה ולפעמים אף היחידה, לתיעוד נוכחותם של מינים חמקניים כחתוליים (Kohn & Wayne, 1997; Farrell *et al.*, 2000). מאחר שסימון בגללים מהווה אמצעי תקשורת בין נמרים, הם מוטלים לרוב במקומות בולטים ומכאן שניתן למוצאם בשטח בקלות יחסית. גללים מכילים תאים שנשרו מדופן המעי ולכן ניתן להפיק מהם DNA של מטיל הגללים עצמו (Hoss *et al.*, 1992). על ה-DNA המופק ניתן ליישם שורה ארוכה של טכניקות מולקולריות המאפשרות לשפוך אור על היבטים שונים ברמת המין, האוכלוסייה והפרט. עם זאת, אחד החסרונות הבולטים שבהשגת DNA

באופן לא-פולשני הוא העדר מידע אקולוגי וביולוגי לגבי הפרט הנדגם כדוגמת גיל, מצב רבייתי ומצב בריאותי (Schwartz *et al.*, 1998).

לצורך קביעת אומדן לגודל האוכלוסיה יש לאתר הבדלים רצפיים בין דגימות ה-DNA השונות, על מנת להבחין בין פרטים שונים. מיקרוסטליטים הינם סמנים גרעיניים הבוחנים את השונות במספר החזרות של רצפים חוזרניים קצרים מאוד (2-6 נוקלאוטידים) לדוגמא $(CA)_n$. אתרי מיקרוסטליטים נפוצים מאוד בגנום של יונקים (מאות אלפי אתרים) והם מציגים שיעור גבוה של פולימורפיזם כתוצאה משיעורי מוטציה גבוהים המשנים את אורך האלל (Allen *et al.*, 1995; Forbes *et al.*, 1995; Kruglyak *et al.*, 1998). מאחר והשיטה נסמכת על טכניקת ה-PCR ניתן באמצעותה להגביר כמויות קטנות של DNA, כמו אלו המושגות באמצעים לא-פולשניים, בקלות יחסית. שימוש במספר אתרי מיקרוסטליטים מאפשר לבנות פרופיל רב-אתרי שיהווה "טביעת אצבע גנטית" ייחודית לכל פרט ופרט באוכלוסיה (Kohn & Wayne, 1997; Culver *et al.*, 2001). באמצעות פרופיל זה ניתן לבדוק באם דגימה חדשה מהווה חזרה על אותו גנוטיפ ייחודי, דהיינו על אותו פרט או שמא מציגה פרופיל חדש המשקף פרט נוסף (Mills *et al.*, 2000). סך כל הגנוטיפים הרב-אתריים הייחודיים שנתקבלו מהווים אומדן מינימלי לגודל האוכלוסיה ויכולים לשמש להערכת גודלה האמיתי של האוכלוסיה (Valiere & Taberlet, 2000).

2. מטרת המחקר

מטרת מחקר זה הינה לשפוך אור על מצבה וגודלה של אוכלוסיית הנמרים במדבר יהודה והנגב באמצעים לא-פולשניים. תוצאות מחקר זה יהוו יסוד ראשוני על בסיסו ניתן יהיה לתכנן מחקרים נוספים וממשק אפקטיבי לשימור האוכלוסיה. במסגרת המחקר בקשתי להשיג את היעדים הבאים :

- איסוף דגימות DNA בדרך לא-פולשנית
- סריקת ה-DNA ברמת המין לצורך זיהוי נמרים
- השוואה בין מוקדי פעילות נמרים כיום לאתרים בהם נצפו נמרים בעבר
- זיהוי נמרים ברמת הפרט
- השוואת השונות הגנטית בקרב נמרי הבר לשונות בין פרטים שהשתייכו לאוכלוסיה בעבר
- זיהוי זוויג הנמר
- אומדן גודל האוכלוסיה

3. שיטות העבודה

3.1 עבודת השטח

דגימות DNA הושגו בשיטה שאינה פולשנית (non-invasive), שאין בה כדי להפריע לבעל החיים בסביבתו הטבעית על ידי לכידה, סימון או מעקב אחריו.

3.1.1 אתרי הדיגום

מאז חודש מרץ 2001 ובמשך כשנתיים נערך איסוף שיטתי של גללי נמרים מרחבי מדבר יהודה והנגב. סריקות השטח נערכו בעיקר באזורים מבוותרים לאורך נחלים, ערוצים מצוקיים וסביב מקורות מים זמניים או קבועים, המהווים בית גידול מועדף לנמרים בשל זמינות מים, טרף ומקומות מסתור. בנוסף, נסרקו אזורים בהם נצפו נמרים במשך עשר השנים האחרונות, בהסתמך על מאגרי מידע המנוהלים על ידי רשות הטבע והגנים ומרכז המידע על יונקים, ובהתאם לדיווחים שהתקבלו במהלך המחקר.

3.1.2 איסוף הגללים

נמרים משוטטים לרוב לאורך שבילים שנוצרו על ידי בעלי חיים שונים, בין בולדרים ומדפי סלע מוגבהים ולעיתים קרובות גם לאורך שבילי מטיילים מרכזיים. סימוני ריח מתבצעים לרוב בשבילים מרכזיים, המשמשים גבולות משותפים בין שטחי מחיה של פרטים שונים (Bailey, 1993), ולפיכך הם מהווים אתרים מתאימים לחיפוש אחר גללים. שיטות מסורתיות לזיהוי גללים על סמך גודל, צורה או ריח אינן אמינות מספיק לאיתור גללי נמרים. בתוך המין עשויה להופיע שונות גדולה בגודל הגוף ובנוסף יכול בעל חיים אינדיבידואלי להטיל גללים בטווח רחב של גדלים (Kohn *et al.*, 1999; Farrel *et al.*, 2000). לפיכך נאספו מרבית הגללים שזוהו כשל טורפים בטווח גודל רחב.

גללים שנמצאו במהלך סריקת שטח המחקר הוכנסו למעטפות נייר נפרדות על גביהן צוין מספר סידורי, נ.צ של אתר הדיגום, תיאור כללי של השטח (כמו למשל: שביל, בולדר או סבך), ותאריך האיסוף. המעטפות הועברו למעבדה ונשמרו בטמפרטורת החדר עד אשר בוצעה הפקת ה-DNA לצורך האנליזה המולקולרית.

3.2 עבודת המעבדה

שטחם החיצוני של גללים מכיל כמות קטנה של תאים שמקורם בנשירת תאי האפיתל המרפדים את פנים המעי (Kohn & Wayne, 1997). תאים אלו היוו מקור להפקת DNA, עליו התבססה בהמשך אנליזה מולקולרית ברמת המין, האוכלוסיה והפרט. בשל תנאי האקלים המדברי נמצאו לרוב הגללים כשהם

יבשים. במקרים בהם נמצאו גללים טריים עלה הצורך לייבש אותם בתנור בטמפרטורה של 60°C למשך לילה אחד לפחות, במטרה להקל על הפרדת השכבה החיצונית של הגלל וכן על מנת למנוע את פירוק ה-DNA על ידי פטריות עובש (Farrel *et al.*, 2000).

DNA הפקת 3.2.1

דגימות DNA הופקו מגללי נמרים מהבר, מהשבי (חי-בר יטבתה), מרקמה משומרת וכן מעורות מעובדים באדיבות המוזיאון הזואולוגי, אוניברסיטת תל-אביב.

הפקת DNA מגללים

מחקרים קודמים הראו כי גללים מכילים חומרים רבים הגורמים לעיכוב של תגובת ה-PCR. מאחר שעבודת המעבדה נסמכה ברובה על תגובה זו הכרחי היה שפרוטוקול הפקת ה-DNA יביא לנטרול חומרים אלו אם על ידי הרחקתם מהמדיום ממנו מוצה ה-DNA ואם על ידי עיכובם. הפקת ה-DNA נערכה בהתאם לפרוטוקול המתואר על ידי Ernest *et al.* (2000), אך עם מספר שינויים. שכבת הגלל החיצונית קולפה בעזרת תער וכ-100 mg מן האבקה הועברו למבחנה שנפחה 1.5 mL. האבקה הורחפה ב-800 μL Lysis buffer ב-0.5% X-Triton, 200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 2% SDS. שהכיל: לאחר מכן הוספו למדיום 20 μL של Proteinase K (20 mg/mL). המבחנות הועברו לאינקובציה באמבט למשך לילה בטמפרטורה של 50°C . בתום העיכול הופרדה שכבת המוצקים מן הפאזה הנוזלית לאחר סירכוז במהירות של 12,000 rpm למשך 10 דקות. הנוזל העליון הועבר למבחנה חדשה ונוקה באמצעות פרוטוקול סטנדרטי הכולל שימוש בפנול (pH 8.0), פנול-כלורופורם (1:1) וכלורופורם. לאחר השקעה אתנולית ושטיפה כפולה ב-70% אתנול יובש משקע ה-DNA ב- 42°C והומס ב-8.0 pH TE 60 μL אשר חומם לטמפרטורה של 37°C . לעיתים נעשה גם שימוש בערכת מיצוי DNA מסחרית (IsoQuick (ORCA) בהתאם לפרוטוקול היצרן. ערכה זו מבוססת על מיצוי בעזרת Guanidium thiocyanate (GuSCN) אשר מעכל את תאי האפיתל וגורם לעיכוב של נוקלאזות. כל מבחנה סומנה בהתאם למספר הסידורי שנרשם על גבי המעטפה במעמד איסוף הגלל מן השטח. מכל הפקה הוכנו שלוש מבחנות שהכילו מיהולים שונים של DNA (1:10, 1:100, 1:1000).

הפקת DNA מרקמה

רקמה משומרת של הנמרה ציה ממצפה רמון נתקבלה באדיבות המוזיאון הזואולוגי של אוניברסיטת תל-אביב. פיסת רקמה בגודל של כ-5 מ"ר הועברה למבחנת 1.5 mL ונכתשה באמצעות כותש פלסטיק. לאחר מכן בוצעה הפקת DNA בהתאם לשלבים שתוארו עבור הגללים.

הפקת DNA מעורות מוזיאון

עורות של בעלי חיים המיועדים לשימור במוזיאון עוברים תהליכי ייבוש וקיבוע באמצעות חומרים שונים המביאים להקשחת העור. חומרים אלו משפיעים על איכות ה-DNA שבעור ולעיתים גורמים לעיכוב תגובת ה-PCR (Iudica *et al.*, 2001). הקשחת העור מקשה על עיכולו ומכאן שהעור המעובד צריך לעבור רה-הידרציה לצורך ריכוך הרקמה ולצורך הרחקת חומרי פיקסציה וחומרים מעכבי PCR. לפיכך לפני הפקת ה-DNA נשטפו פיסות עור שמשקלן כ-25 mg ב-250 μ L PBS ל-10 דקות בטמפרטורה של 55 °C שלוש פעמים. לצורך הפקת DNA נעשה שימוש בערכה המסחרית DNeasy (Qiagen). פרוטוקול היצרן הותאם לעבודה עם רקמה קשה לעיכול בהתאם לפרוטוקול המוצע על ידי Iudica *et al.* (2001). שלב העיכול באמצעות Proteinase K הוארך ל-72 שעות, במהלכן הוסף למבחנות אנזים כל 12 שעות.

3.2.2 זיהוי מין הטורף ממנו הופק DNA

שיוך גלל למין הטורף שהטיל אותו על סמך מראהו בלבד אינו אפשרי, אלא אם הוטל הגלל בעת תצפית ישירה על הטורף. מכאן עולה הצורך במיון הגללים שנאספו על פי מיני הטורפים הגדולים המתקיימים בשטח המחקר, אשר להם גללים בעלי מאפייני גודל וצורה דומים. לצורך הבדלה זו הוגברו מקטעי DNA מיטוכונדריאלי מגנים שמציגים שונות גבוהה יחסית בין מינים שונים של טורפים (Johnson & O'Brien, 1997).

הגברת גן מיטוכונדריאלי באמצעות PCR וריצוף המקטע

מקטע של גן מיטוכונדריאלי הוגבר באמצעות PCR תוך שימוש בפריימרים אוניברסאליים לגנים 16S-rRNA (376bp) או NADH-5 (315bp) (Johnson *et al.*, 1998). על מנת למצוא את מיהול דגימת ה-DNA המאפשר הגברת PCR וריכוז תוצרים אופטימלי, נעשה שימוש ב-2-3 מיהולים של כל דגימה. המיהול שנמצא כיעיל ביותר, שימש להמשך האנליזה המולקולרית. כל ריאקציה כללה מבחנות ביקורת חיובית ושלילית (בה

הוחלף ה-DNA ב- ddH_2O). במידה והתקבל תוצר PCR במבחנת הביקורת השלילית, נזרקו כל מבחנות הריאקציה. התערובת לתגובת ה-PCR הוכנה באופן הבא:

2.5 μL 10 x Reaction buffer (no Mg)

3.75 mM MgCl_2

2.5 mM each dNTP

6-10 pmol each primer

0.5-1 U Taq DNA polymerase (Fisher biotec)

2.5 μg BSA

2 μL DNA template

ddH_2O to final volume of 25 μL

תנאי תגובת ה-PCR:

3 min 94 °C

[30 sec 94 °C; 45 sec X °C; 1 min 72 °C] X 35

10 min 72 °C

כאשר X מסמל את טמפרטורת הצימוד: 55 °C עבור 16S ו 45 °C עבור NADH-5.

תוצרי ההגברה עברו השקעה אתנולית לפני שנשלחו לקביעת רצף המקטע המיטוכונדריאלי ביחידת הרצף של אוניברסיטת תל-אביב. הריצוף נעשה באמצעות מכשיר הריצוף האוטומטי ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer.

קביעת מין בעל החיים על סמך רצף הגן המיטוכונדריאלי

רצף הגן המיטוכונדריאלי נבדק באמצעות תוכנת BLAST המצויה באתר האינטרנט של NCBI. תוכנה זו מבצעת עימוד (pairwise alignment) בין רצף השאילתא לבין כל הרצפים המצויים במאגר ה-GenBank. פלט התוכנה כולל רשימה של רצפים בעלי דמיון לרצף השאילתא ואת מין בעל החיים ממנו נגזר אותו רצף, על פי סדר יורד של דמיון. כלומר, הרצפים המופיעים בראש הרשימה הינם הרצפים הדומים ביותר לרצף השאילתא. על סמך תוצאות אלו הופרדו כל דגימות ה-DNA שמקורן בנמרים משאר הדגימות, לצורך המשך האנליזה לזיהוי זוויג הנמר וקביעת הפרופיל הגנטי האינדיוידואלי שלו באמצעות מיקרוסטילטים.

3.2.3 בחינת השונות הגנטית באוכלוסיה וזיהוי אינדיקטורים של פרטים

בחינת השונות הגנטית באוכלוסיה וזיהוי אינדיקטורים של פרטים, מאפשרת לקבוע את מספר הפרטים המינימלי באוכלוסיה. באוכלוסיות טורפים תראה לרוב שונות גנטית נמוכה יחסית בשל תחלופה גנטית (gene flow) בין אוכלוסיות כתוצאה מהמרחקים הגדולים אותם עוברים הפרטים במהלך חייהם (Paetkau *et al.*, 1995).

אנליזת אתרים מיקרוסטליטיים

היתרון שבשימוש במיקרוסטליטים על פני סמנים מולקולריים אחרים טמון בכך שהם נפוצים מאוד ומציגים פולימורפיזם אפילו באוכלוסיות בהן לא נראית שונות אלזימית או מיטוכונדריאלית (Paetkau & Strobeck, 1994). היות ושימוש במיקרוסטליטים מבוסס על PCR, אורכם הקטן של הסמנים המיקרוסטליטיים מאפשר שימוש בדגימות DNA באיכות ירודה, כמו אלו המופקות מגללים.

דגימות DNA נסרקו כנגד 31 זוגות פריימרים לאתרים מיקרוסטליטיים פולימורפיים שבודדו מספריה גנומית של חתול הבית (Menotti-Raymond *et al.*, 1999). תנאי הכנת התערובת ותכנית ה-PCR זהים לאלו שתוארו עבור מקטע מיטוכונדריאלי. בדגימות DNA בעייתיות, שלא הגיבו תחת תנאים אלו, הוארך שלב הצימוד בתגובת ה-PCR מ-45 שניות לדקה.

תוצרי ה-PCR עברו אלקטרופורזה בג'ל פוליאקרילאמיד שהכיל: 0.42 g/mL Urea, 8% אקרילאמיד ביחס של 1:19 ביס-אקרילאמיד ואקרילאמיד בהתאמה ו-TBEx1 בתוך מים מזוקקים. בכל באר הוטענו 6 µL של תערובת תוצר PCR ותמיסת דנטורציה ביחס של 1:1 שעברו דנטורציה של 5 דקות ב-95 °C והועברו למי קרח. הטענת הדגימות נערכה בסטים של 10-15 דגימות כשלצידן הוסף סמן גודל בעל מקטעים הנבדלים זה מזה ב-4 בסיסים. סמן הגודל נבחר באופן שטווח הגדלים בו יתאים לגודל התוצר הצפוי לזוג הפריימרים הספציפי. בתום הרצה של כ-3 שעות נצבע הג'ל על ידי צביעת כסף, על פי הפרוטוקול המופיע בנספח א-1.

לצורך ניתוח התוצאות נקבעו גדלי האללים על סמך סמן הגודל שהורץ במקביל לדגימות ה-PCR.

לאחר השלמת טבלה בה מרוכזות כלל התוצאות, נעשה שימוש בתוכנת GIMLET v.1.3.2 (http://pbil.univ-lyon1.fr/software/Gimlet/gimlet.htm) (Valiere, 2002). התוכנה משתמשת בקובץ טקסט בפורמט GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995) בתור קלט ומאפשרת למצוא את מספר הגנוטיפים הייחודיים.

ריצוף אללים באמצעות שיבוט בפלסמיד

אתר מיקרוסטיליטי זוהה כפולימורפי אם לפחות דגימה אחת מאוכלוסיית הבר הציגה בו דגם אללי אשר לא הופיע בשאר הדגים מן הבר. על מנת לרצף אללים שונים לאתר מיקרוסטיליטי אחד יש לאתר פרטים שמציגים דגם הומוזיגוטי לכל אלל. אולם, ייתכן מצב בו אתר מיקרוסטיליטי מציג דגם הומוזיגוטי לאלל אחד בלבד. במקרה כזה שובט בפלסמיד תוצר PCR של פרט הטרוזיגוט לאתר הפולימורפי, במטרה להביא את שני האללים לידי ריצוף. קביעת גודלם של אללים מתוך ג'ל פוליאקרילאמיד עשויה לסבול מהטיה בשל אינטרפרטציה סובייקטיבית של החוקר, ולפיכך ריצוף האללים יכול לאשש או להפריך אותה. לצורך כך, נעשה שימוש בערכת pGEM-T Easy (Promega). ליגציה וטרנספורמציה נערכו על פי הפרוטוקול המופיע בנספח א-2.

מבחנות הטרנספורמציה הועברו לאינקובציה במי קרח למשך 45 דקות, ולבדוק שחומם ל-42 °C (heat-shock) למשך דקה והוחזרו למי הקרח למשך 3 דקות. לכל מבחנה הוסף 1 mL של LB והן הועברו לאינקובציה בטלטול ב-37 °C למשך שעה. לאחר ריכוז התרחיף נזרעו כ-200 µL על צלחות LB שהכילו Ampicillin ו-X-Gal, IPTG. לאחר אינקובציה ב-37 °C למשך לילה הועברו דגימות ממושבות למבחנות שהכילו 0.6 mg Ampicillin בתוך 4 mL של LB. לאחר אינקובציה נוספת למשך לילה ב-37 °C נלקח 1 µL מתרחיף החיידקים כ-Template ל-PCR. תערובת ה-PCR כללה את הפריימרים של המחדר ותנאי הריאקציה היו זהים לאלו ששימשו להגברת המחדר. על מנת לבדוק אם גודל תוצר ה-PCR תואם את הגודל הצפוי הורצה במקביל לתוצרי השיבוט ביקורת חיובית שהכילה DNA מקורי של נמר. תוצרים בגודל המתאים הורצו בג'ל פוליאקרילאמיד במטרה להבדיל בין תרביות של חיידקים שקלטו פלסמיד בו אלל (מחדר) אחד לבין אלו שקלטו את האלל השני המיוצג בהטרוזיגוט. לאחר צביעת הכסף נבחרו שתי מבחנות של תרבית חיידקים המכילות כל אחת מחדר אחר והופק מהן הפלסמיד בעזרת ערכת QIAprep (Qiagen), בהתאם להוראות היצרן. הפקות הפלסמיד נמסרו לריצוף ביחידת הרצף של אוניברסיטת תל-אביב בתוספת פריימר של הפלסמיד (Sp6) כך שניתן יהיה לאתר ברצף את האלל במלואו, כולל את הפריימרים המקוריים שלו. לאחר מכן הושו רצפי שני האללים בעזרת תוכנת ClustalX כך שניתן היה לבדוק את מספר הרצפים החוזרניים השונה בכל אלל.

MHC-SSCP

שיטת ה SSCP (Single strand conformational polymorphism) הינה שיטה רגישה המשמשת לאיתור שונות רצפית בין מקטעי DNA (Sunnucks *et al.*, 2000). השיטה מבוססת על נדידה דיפרנציאלית של מקטעי DNA חד גדילי בגיל (תוצרי PCR לרוב), בתנאים לא דנטורטיביים. ההנחה המרכזית בשיטה זו היא ששני מקטעי DNA הנבדלים זה מזה בנוקלאוטיד אחד או יותר יצרו מבנים מרחביים שונים אשר יגרמו להם לנדוד למרחקים שונים בגיל.

אתרי MHC (Major histocompatibility complex) מקודדים לחלבונים המעורבים בתגובה האימונית בבעלי חיים. אתרים אלו הינם פולימורפיים במיוחד, כלומר גנומים אינדיוידואליים צפויים להיות שונים זה מזה (Lewin, 1990) ולפיכך מהווים יעד פוטנציאלי למציאת שונות גנטית בין פרטים שונים. Feca-DRB הינו גן מקבוצת ה- MHC class II, בו נמצאה שונות גבוהה (61 אללים) בקרב חתולי בית (Yuhki & *Felis catus*; O'Brien, 1997).

מקטע מהגן Feca-DRB הוגבר באמצעות תגובת PCR תוך שימוש בזוג הפריימרים DRB219 ו- DRB61A (Yuhki & O'Brien, 1997). תנאי הכנת התערובת ותכנית ה-PCR זהים לאלו שתוארו עבור מקטע מיטוכונדריאלי למעט טמפרטורת הצימוד שהותאמה ל-55 °C. תוצרי PCR שנראו בגיל אגרוז 1% הורצו בגיל המסחרי (Pharmacia Biotech) CleanGel DNA Analysis Kit בהתאם להוראות היצרן. לאחר אלקטרופורזה של כשעה נצבע הגיל באמצעות צביעת כסף על פי הפרוטוקול המתואר עבור גיל פוליאקרילאמיד.

3.2.4 בדיקת זכריות

מאחר שכרומוזום המין Y קיים אך ורק בזכרים, הוא מהווה יעד אידיאלי לזיהוי של זכרים. בדיקת הזכריות נערכה בשתי שיטות שונות: הגברת PCR והיברידיזציה, שתיהן מבוססות על השימוש ברצפי DNA ספציפיים לכרומוזום Y.

קביעת זכריות באמצעות PCR

בתגובות PCR נעשה שימוש בפריימרים המכוונים לגנים שונים על כרומוזום Y. לצורך כך נבחרו חמישה זוגות פריימרים: UBEYF/UBEYR (Murphy *et al.*, 1999), SRYF/SRYR (Lyons *et al.*, 1997), δ ZfYF/Exon6R (Slattery *et al.*, 2000) ו- ZF2F/ZFY1R, ZFY1F/ZF2R (Slattery & O'Brien, 1998).

המייצרים תוצרי הגברה באורכים שונים. תערובת ה-PCR ותכנית הריאקציה זהות למתואר עבור גן מיטוכונדריאלי למעט הבדלים בטמפרטורת הצימוד. קבלת תוצר PCR בגודל הצפוי מאפשרת להניח כי מקור דגימת DNA בנמר זכר. החיסרון של השיטה בא לידי ביטוי במקרים בהם לא נתקבל תוצר PCR בשל חוסר היכולת להבדיל בין דגימת DNA שמקורה בנקבה לבין מצב של כשל תגובת ה-PCR (Chaliyawan & Limprasert, 2000). עבור דגימות DNA שלא הגבירו בתנאי הריאקציה שתוארה נערכה תגובת PCR נוספת בתנאים מקלים בשלושת המחזורים הראשונים;

3 min 94 °C

[1 min 94 °C; 1 min X- 8°C; 1 min 72 °C] X 3

[30 sec 94 °C; 45 sec X °C; 1 min 72 °C] X 35

10 min 72 °C

כאשר X מסמל את טמפרטורת הצימוד המחושבת, המשתנה עבור כל זוג פריימרים בטווח טמפרטורות של 50-60 °C.

במקביל נעשה שימוש גם בזוג הפריימרים - rps4XF/rps4XR, המכוונים לכרומוזום המין X (Murphy *et al.*, 1999), כביקורת לאיכות דגימות ה-DNA. במצב אידיאלי צפוי שמכל דגימות ה-DNA יתקבל תוצר PCR, שכן כרומוזום X מופיע בזכרים כמו גם בנקבות. מכאן שניתן להשוות את תוצאות ההגברה שהתקבלו לכל פרט. בדוגמא בה לא התקבל תוצר לכרומוזום Y וכן התקבל תוצר לכרומוזום X ניתן להניח, אם כי ללא וודאות, כי מדובר בנקבה.

קביעת זכריות באמצעות היברידיזציה (DNA dot-blotting)

שיטת ההיברידיזציה לצורך זיהוי זכרים צפויה לתת תוצאות אמינות וחד משמעיות יותר בהשוואה לתוצאות תגובת PCR. להבדיל מתגובת ה-PCR העשויה להיות מעוכבת על ידי גורמים שונים במדיום הריאקציה, תהליך ההיברידיזציה אינו תלוי בפעילות אנזים ומכאן שמדובר בשיטה אמינה יותר. טכניקת ה-dot-blotting מבוססת על היברידיזציה בין אוליגונוקלאוטיד מסומן במולקולות digoxigenin (DIG-11-) anti-DIG לבין דגימות DNA אשר עברו קיבוע לממברנה. לצורך איתור ההיבריד נעשה שימוש בנוגדן anti-DIG שבנוכחות סובסטרט מתאים יוצר סיגנל אור שנראה לאחר חשיפת הממברנה לפילם X-ray. לצורך הכנת

תוצר PCR מסומן נעשה שימוש בערכה המסחרית PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche). התהליך התבצע על פי פרוטוקול היצרן אך עם שינויים קלים בריכוזי הריאגנטים (נספח א-3).

3.3 אומדן גודל אוכלוסיית הנמרים בבר

ניתן להעריך גודל אוכלוסיה מנתונים גנטיים באמצעות שיטת ה-Rarefaction curve העורכת אקסטרפולציה לעקומה שטרם הגיעה לרוויה (Kohn & Wayne, 1997; Kohn *et al.*, 1999; Valiere, 2002; Eggert *et al.*, 2003). בהנחה שכל גנוטיפ ייחודי מייצג נמר אחר, גודל האוכלוסיה מוערך כאסימפטוטה של עקומה המתארת את מספרם המצטבר של גנוטיפים ייחודיים כפונקציה של מספר הגללים שנבחנו. תוצאות האנליזה של המיקרוסטליטים הוזנו לתוכנת GIMLET המייצרת קובץ המשמש קלט לתוכנה R 1.8.0 (http://cran.us.r-project.org/src/base/R-1.8.0.tgz) (Ihaka & Gentleman, 1996), לצורך אנליזה סטטיסטית של הנתונים. תוכנת GIMLET מאפשרת להשתמש ב-3 משוואות שונות, מהן ניתן לבחור את זו המתאימה ביותר לנתוני המחקר. המשוואות בהן נעשה שימוש הן:

$$(1) y = ax/(b+x) \text{ (Kohn et al, 1999)}$$

$$(2) y = a - a[1 - (1/a)]^x \text{ (Chessel's equation; Valiere, 2002)}$$

$$(3) y = a[1 - e^{-bx}] \text{ (Eggert et al, 2003)}$$

בפונקציות המתוארות x הוא מספר הגללים שנדגמו, y הוא מספרם המצטבר של גנוטיפים ייחודיים שנתגלו ב-x הגללים, a היא האסימפטוטה של הפונקציה ולכן מעריכה את גודל האוכלוסיה ו-b (למעט במשוואת Chessel) הינו שיפוע לא-לינארי של הפונקציה אשר יורד ככל ש-x גדל.

הסדר שבו נבחנות הדגימות עשוי להשפיע על ערך האסימפטוטה (a) (Kohn *et al.*, 1999). לפיכך נערכו 1000 חזרות של דיגום אקראי ובכל פעם הוערך a מחדש. פלט תוכנת R מציין ערכו הממוצע של הפרמטר a וכולל פירוט של נתוני 1000 החזרות, מהן חושב רווח בר-סמך של 95% ל-a הממוצע.

4. מהלך העבודה ותוצאותיה

4.1 ניסוי מקדים עם גללי טורפים מחי-בר יטבתה

על מנת לוודא כי שיטות הפקת ה-DNA והגברת הגן המיטוכונדריאלי מתאימות לעבודה עם גללים, נערך ניסוי מקדים בו נאספו גללים של טורפים גדולים המצויים בחי-בר יטבתה. מבין הטורפים הגדולים נבחרו רק אלו המיוצגים בשטח המחקר; נמרים, צבועים וזאבים. לשלושת טורפים אלו גללים בעלי מאפייני גודל, מראה ותכולה דומים, ומכאן שקשה להבדיל ביניהם בעת איסופם מן השטח. מטרה נוספת של ניסוי זה הינה לבדוק אם רצף הגן 16S מאפשר להבדיל בין מיני הטורפים השונים.

תהליך הפקת ה-DNA יושם על 4 גללי נמרים, 2 גללי צבועים ו-2 גללי זאבים. מאחר ולא ניתן היה לשייך גללים לפרטים ספציפיים, שכן הם נאספו אקראית מתוך כלובים, יש לציין כי מספר הפקות DNA לכל מין עשויות למעשה להיות מספר חזרות של פרט אחד. במטרה לבדוק אלו גללים או חלקים בגלל מכילים את כמות ה-DNA הגבוהה או האיכותית ביותר, נערך רישום בו תואר כל גלל על פי המאפיינים הבאים: תכולה (פרווה, חומר צמחי, עפר), מרקם (מתפורר, קשיח), מאיזה חלק נלקחה הדגימה (קרום חיצוני, קרום ותוכן גלל) וכמות החומר (משקל) שהועברה למבחנה. בהרצת מיצויי ה-DNA בג'ל אגרוז 1% נראה היה כי אכן בודד DNA, אולם האינדיקציה הטובה ביותר לאיכות ההפקה הינה תוצאות תגובת PCR. במספר תגובות PCR כוילו כל תנאי הריאקציה ונקבע זוג הפריימרים שיביאו לתוצאות אופטימליות. תוצאות הגברת הגן 16S היו טובות מאלו של NADH-5 ולפיכך הוחלט לעבוד בעיקר עם גן זה. רק במקרה בו לא נראה תוצר PCR לגן 16S כלל, נערך ניסיון נוסף להגברה באמצעות הפריימרים לגן NADH-5. תוצרי PCR של שלושת מיני הטורפים נשלחו לריצוף ועל מנת לוודא כי מין הטורף המתקבל תואם את הידוע מראש, הושווה רצף הנוקלאוטידים עם רצפים במאגר ה-GenBank באמצעות תכנת BLAST.

תוצאות הניסוי הראו כי פרוטוקול הפקת ה-DNA מתאים להפקה מגללים. נמצא כי בגללים קשיחים מהם נלקח חומר מהקרום החיצוני בלבד, בכמות שלא עולה על 150 mg, התקבלה כמות גדולה יותר של DNA ותוצאות טובות בתגובת PCR. נמצא כי רצפו של מקטע הגן 16S מאפשר להבדיל בין שלושת מיני הטורפים. בכל אחד משלושת המינים כלל פלט תכנת BLAST בראש רשימת הרצפים (כלומר, בעלי הדמיון הגבוה ביותר) את רצף הגן 16S של מין הטורף הצפוי. מכאן שזיהוי מין הטורף אמין ויכול להיות מיושם על מיצויי DNA ממקור לא ידוע.

הנמרים המתקיימים בחי-בר יטבתה הינם ממקור אסיאתי ומשתייכים לתת מין שונה מזה המצוי בארץ. לפיכך, מאחר והפקות ה-DNA מגלליהם עלו יפה, הן נשמרו ושימשו קבוצת חוץ (out-group) בהמשך

האנליזה המולקולרית. ניסוי מקדים לצורך הבדלה בין זוויגי הנמרים לא התאפשר מאחר ולא ניתן היה להבדיל בין גללי זכר לנקבה שכן הם לא נצפו בעת הטלת הגללים.

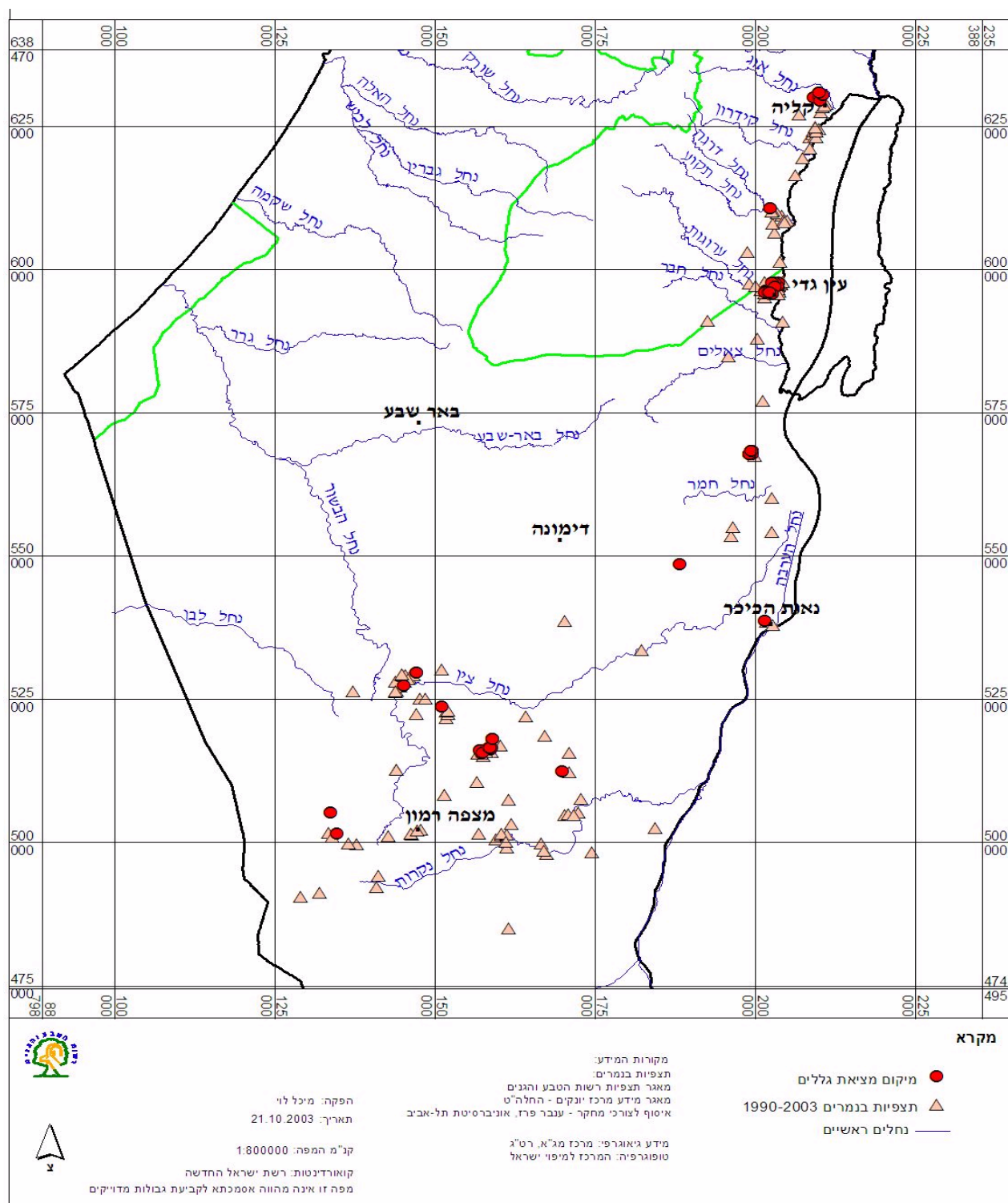
4.2 ממצאי גללים בשטח המחקר

במהלך 40 ימי שטח נאספו 268 גללים מרחבי מדבר יהודה והנגב. לרוב נמצאו הגללים בשולי שבילים מרכזיים, בצנירים ובסמיכות למקורות מים. אתרים בהם הסתמנה פעילות של נמרים, אם בשל ממצאי גללים ואם בשל המצאות חפירות סימון או עקבות, נסרקו יותר מפעם אחת. מרבית הגללים שנמצאו היו יבשים ורק במקרים בודדים נמצאו גללים טריים אשר דרשו ייבוש בטרם הוחל תהליך הפקת ה-DNA.

מיון הגללים על פי מין הטורף

מכלל הגללים שנאספו 112 הפקות DNA (42%) הניבו תוצרי PCR לגן המיטוכונדריאלי 16S, באופן שאפשר את קביעת רצף המקטע. מאחר והשונות התוך מינית בגן זה מתונה, הוא מתאים לצורך זיהוי המין (Kohn & Wayne, 1997). מין הטורף שהיווה את המקור ל-DNA זוהה באמצעות תכנת BLAST באתר האינטרנט של NCBI. בתור קלט שימש רצף תוצר ה-PCR לגן 16S. סך הכל זוהו: 54 גללי נמרים (48.2%), 8 גללי צבועים (7%), 42 גללי זאבים (37.5%), 5 גללי קרקלים (4.5%) ו-3 של מינים אחרים. חשוב לציין כי מספרים אלו אינם מציינים את מספר הפרטים מכל מין אלא את מספר דגימות ה-DNA שהופקו לכל מין. בשלבי המחקר הראשוניים נאספו כל הגללים שזוהו כגללים של טורפים גדולים, אולם עם רכישת הניסיון בזיהוי גללי נמר נאספו פחות ופחות גללים שלא תאמו את המראה האופייני ולכן עלה אחוז הגללים שמקורם בנמרים. 27 הנמרים הראשוניים שזוהו נבררו מתוך 71 דגימות (38%) אשר עברו את שלב הריצוף. 27 דגימות הנמרים הבאות זוהו מתוך 41 (66%) דגימות שרוצפו. מבין 54 גללי הנמרים: 35 נמצאו במדבר יהודה, 16 בהר הנגב ו-3 באזור הערבה.

נקודות הציון של אתרי איסוף בהם נמצאו גללי נמרים הועלו על מפת GIS (איור 2) בה מצוינים גם אתרים בהם נצפו נמרים מאז שנת 1990 (נתוני תצפיות בבעלי חיים, רשות הטבע והגנים והחברה להגנת הטבע). לאחר חלוקת המפה לריבועים המכסים שטח של 10 קמ"ר קובצו מספר ריבועים בהתאם לאתרי הדיגום (לדוגמא, שמורת עין גדי חולשת על שני ריבועים). על מנת לבחון את מידת ההתאמה בין מספר התצפיות בנמרים לבין מספר גללי הנמרים שנמצאו בכל אתר דיגום נערך מבחן קורלציה דיכוטומי.



איור 2- אתרים בהם נמצאו גללים אשר זוהה כי מקורם בנמר, בהשוואה לאתרים בהם נצפו נמרים ב-10 השנים האחרונות.

מקדם המתאם (R) שהתקבל שווה 0.61 ($p=0.008$). במרבית האתרים בהם נצפו נמרים אך לא נמצאו גללים מספר התצפיות היה נמוך. אולם, במהלך 10 השנים האחרונות נתקבלו דיווחים רבים על תצפיות בנמרים

ממספר אתרים באזור מזרח הר הנגב ועל אף שנשרקו מספר פעמים, לא נמצאו בהם כלל גללי נמרים. מכאן עיקר התרומה לערכו הנמוך של מקדם המתאם.

4.3 זיהוי אינדיוידואלי

4.3.1 סמנים מיקרוסטליטיים

נמרי החי-בר

באנליזת המיקרוסטליטיים שימשו ארבע דגימות DNA משני נמרי החי-בר קבוצת חוץ (out-group) לדגימות מנמרי הבר. אולם במקביל ניתן היה לבחון האם תוצאות האנליזה יחזו כי מדובר בשני פרטים בלבד או שמא יעריכו ביתר או בחסר את מספר הפרטים. מאחר ודגימות ה-DNA הופקו מגללים של זכר ונקבה המתקיימים יחד בכלוב אחד, ללא מידע מקדים- אלו גללים שייכים לאיזה פרט, לא ניתן היה לדעת אם ארבע הפקות ה-DNA מייצגות את שני הנמרים או רק אחד מהם. תוצאות אנליזה של 8 אתרי מיקרוסטליטיים מוצגות בטבלה 1. התוצאות אמנם אינן מלאות אך די בהן על מנת לערוך קיבוץ שמאחד את דגימות A, B ו D ומבדיל אותן מדוגמא C. כלומר, 3 הדגימות A, B ו D מייצגות נמר אחד ואילו דוגמא C לבדה מייצגת את הנמר השני. שימוש בתכנת GIMLET, העורכת קיבוץ של גנוטיפים זהים, מאשש חלוקה זו ולמעשה די היה בתוצאות 3 האתרים הראשונים (Fca453, Fca096, F38) על מנת לערוך את האנליזה שכן 5 האתרים הנוספים אינם תורמים לשונות בין הדגימות.

טבלה 1- תוצאות אנליזת אתרי מיקרוסטליטיים בקרב נמרי החי-בר. השוואה בין גדלי האללים (bp) של 4 דגימות DNA (A-D) שהופקו מגללים של שני נמרים מחי-בר יטבתה, המשתייכים לתת מין שונה מזה המצוי בדרום הארץ. בכתב מודגש מסומנים האללים המאפשרים הבדלה בין דגימה C ל-3 האחרות.

אתר	A	B	C	D
Fca453	193 ,169	193 ,169	173 ,173	193 ,169
Fca096	-	214 ,194	198 ,198	214 ,194
F37	225 ,225	-	227 ,227	225 ,225
Fca310	188 ,160	188 ,160	188 ,160	188 ,160
Fca391	215 ,215	215 ,215	215 ,215	215 ,215
Fca077	152 ,144	152 ,144	-	-
F115	230 ,200	230 ,200	-	-
Fca223	177 ,177	177 ,177	-	177 ,177

נמרי מוזיאון

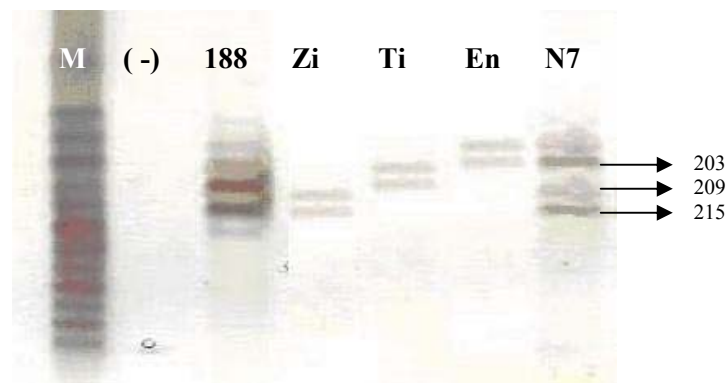
על מנת לבחון את כושרם של האתרים המיקרוסטיליטיים להבדיל בין פרטים שונים נערכה בדיקה שיושמה על DNA שהופק מרקמה משומרת ומעורות נמרים מהמוזיאון הזואולוגי של אוניברסיטת תל-אביב. מאחר ודגימות ה-DNA נלקחו מפרטים שונים וידועים, ניתן היה לבחון האם אתר מסוים או שילוב תוצאות ממספר אתרים מאפשרים את ההבדלה ביניהם. בנוסף לכך, מאחר ומדובר בעורות של פרטים שהשתייכו בעבר לאוכלוסיות המחקר, ניתן היה לבדוק האם אללים שהיו קיימים באוכלוסיה בעבר אינם באים לידי ביטוי באוכלוסיה בהווה ולהיפך, האם קיימים באוכלוסיה הנוכחית אללים חדשים.

בטבלה 2 מוצגות תוצאות הזיהוי האינדיוידואלי באמצעות 8 אתרי מיקרוסטיליטים אשר יושם על דגימות מעורות של 4 נמרות (N7, תיהמת, אניגמה, וציה) מהמוזיאון הזואולוגי. שלושה אתרים (Fca094, Fca223, Fca096) לא הציגו שונות גנטית כלל בקרב הדגימות. על אף ששאר האתרים הציגו שונות גנטית, די היה באתר Fca391 על מנת להבדיל בין ארבע הנמרות, כולן בנות אותו תת מין. באתר זה הציגו הנמרות 3 אללים ב-4 דגמים שונים (איור 3). ללא אתר דיאגנוסטי זה, לא ניתן היה להבדיל בין הנמרה ציה לנמרה תיהמת בהסתמך על שבעת האתרים הנוותרים, כלומר ניתן היה לקבוע כי קיימים שלושה פרטים שונים ולא ארבעה. מתוך שמונת האתרים שנבחנו, חמישה מציגים מצב הטרוזיגוטי בנמרה N7, בעוד שלושת הפרטים האחרים מציגים רק אתר אחד הטרוזיגוטי כל אחד.

התוצאות המוצגות בטבלה 2 שימשו ליצירת קובץ קלט לתכנת GIMLET לצורך קביעת מספר הגנוטיפים הרב-אתריים הייחודיים. פלט התוכנה קבע כי קיימים 4 דגמים גנוטיפים רב-אתריים שונים כלומר, כל פרט מיוצג על ידי גנוטיפ שונה. כאשר הוכן קובץ קלט נוסף שכלל תוצאות של 4 נמרי מוזיאון נוספים (הנתונים אינם מוצגים) שהגיבו רק ל-1 עד 3 אתרים וכוללים נתונים חסרים רבים, פלט התוכנה קבע עדיין כי קיימים 4 דגמים שונים בלבד. זאת, על אף שמדובר ב-8 פרטים שהשתייכו לאוכלוסיית הבר בתקופות שונות, שסביר כי אינם קרובי משפחה מדרגה ראשונה. כלומר, במקרה זה של שימוש בנתונים חסרים לא ניכרת תרומה לשונות או לכושר ההפרדה בין הפרטים.

טבלה 2- תוצאות אנליזה של אתרים מיקרוסטליטיים בארבע הפקות DNA מעורות נמרים (*P.p. nimr*) שאכלסו את שטח המחקר בתקופות שונות. בכתב מודגש מסומנים אללים המאפשרים הבדלה בין הפרטים השונים.

מדבר יהודה			נגב	שם הנמר (שנת מוות) אתר/גודל האלל (bp)
(1964) N7	תיהמת (1986)	אניגמה (1995)	ציה (1998)	
177, 177	177, 177	177, 177	177, 177	Fca223
177, 173	173, 173	173, 173	173, 173	Fca453
212, 206	212, 206	212, 212	212, 206	F115
215, 203	209, 209	203, 203	215, 215	Fca391
210, 210	210, 210	210, 210	210, 210	Fca096
184, 172	172, 172	184, 172	172, 172	Fca310
202, 226	202, 202	202, 202	202, 202	Fca105
214, 214	214, 214	214, 214	214, 214	Fca094
5	1	1	1	מס' האתרים ההטרוזיגוטים

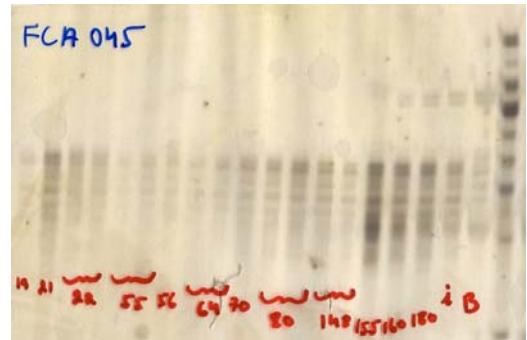
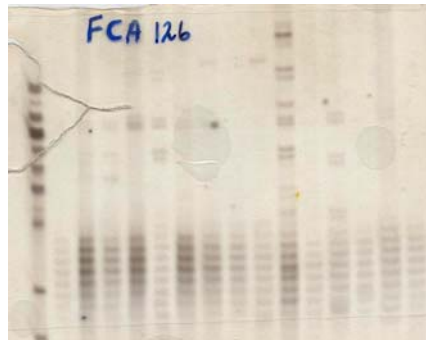


איור 3- דגמי האללים באתר Fca391 בארבע נמרות מוזיאון. En- אניגמה, Ti- תיהמת, Zi- ציה ו- N7. הנמרות הציגו דגמים שונים באופן שאפשר זיהוי פרטני. 188- פרט מאוכלוסיית מדבר יהודה הנוכחית, (-) ביקורת שלילית ו-M- סמן גודל. המספרים ליד החיצים מתארים את גודל האלל (bp).

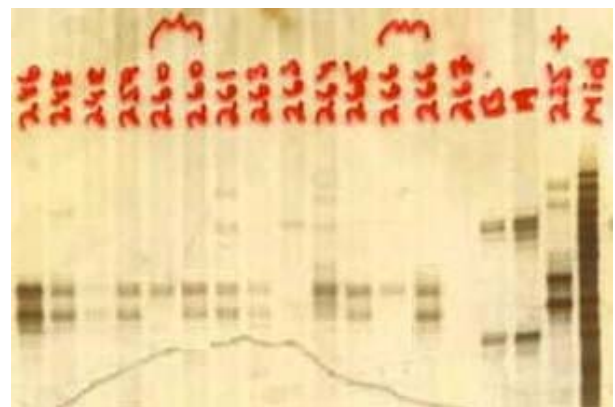
אוכלוסיית הבר

מתוך 31 אתרים מיקרוסטליטיים (רובם דינוקלאוטידים) בהם נעשה שימוש, שישה אתרים (19%) לא הגיבו כלל בתגובת PCR. על אף ניסיונות רבים לשנות את תנאי התגובה על ידי שימוש בריכוזי DNA שונים, שינויים בריכוז המגנזיום או בטמפרטורה בשלבים השונים של תגובת ה-PCR, לא נתקבלו תוצרים. 12 אתרים נוספים (39%) אמנם הניבו תוצרים, אך ממראה ג'ל הפוליאקרילאמיד לא התאפשר פענוח של הפסים משום שלא נתקבל דגם ברור של אללים, כי אם מספר רב של פסים בגדלים שונים (Shadow-bands) (איור 4). תופעה זו הינה תוצאה של החלקה של גדיל ה-DNA בזמן תהליך ההגברה של סמנים

מיקרוסטליטיים, בעיקר דינוקלאוטידים, המקבלת ביטוי ויזואלי בגיל (Paetkau & Strobeck, 1994;)
(Taberlet *et al.*, 1996). לכן בדגימות בהן ריכוז ה-DNA נמוך באם ההחלקה מתרחשת בשלבים הראשונים
של ההגברה, מתקבלים פסים רבים המקבלים ביטוי בגיל. על אף ניסיונות לשנות פרמטרים שונים בתהליך
ה-PCR או את תנאי הרצת הגיל, לא ניתן היה לשפר את מראה הפסים. ב-13 האתרים הנותרים (42%)
נתקבלו תוצרים באופן שאפשר זיהוי של אללים בגיל (נספח ב). ארבעת האתרים בהם נתקבלו התוצאות
הברורות ביותר הם: F115, Fca223, Fca391 ו-Fca453 מתוכם רק Fca223 הינו דינוקלאוטיד (Uphyrkina *et al.*, 2001).
מתוך 13 האתרים, 7 הציגו דגם אללי מונומורפי בקרב כל דגימות ה-DNA שהגיבו. 6 מאתרים
אלו (F115, Fca441, Fca310, Fca224, Fca094, Fca077, F37) הציגו דגם הומוזיגוטי, בעוד האתר השביעי (F115)
הציג דגם הטרוזיגוטי. 4 אתרים נוספים (Fca453, Fca391, Fca223, Fca096) הציגו שונות גנטית בקרב
דגימות ה-DNA ויצרו דגם אללי ברור בגיל פוליאקרילאמיד. מאחר ובאתרים אלו אחוז הדגימות שהגבירו
היה הגבוה ביותר, הושקע בהם מאמץ גדול במיוחד על מנת לקבל תגובה מכלל דגימות ה-DNA. כל דגימה
נסרקה לפחות פעמיים כנגד כל זוג פריימרים וכך הובטח שאמינות התוצאות באתרים אלו תהיה גבוהה.
במקרים בהם התקבלו הומוזיגוטים לאתרים אלו או לאתרים אחרים- בהם מרבית הדגימות הציגו דגם
הטרוזיגוטי, נבחנו אותן דגימות לפחות פעמיים נוספות על מנת לוודא כי לא נוצר מצב של השמטות אלל
(Allelic dropout). במקרים בהם בהגברות חוזרות הציגה הדגימה דגם הטרוזיגוטי בדומה לזה המוצג בשאר
הדגימות מאוכלוסיית הבר (איור 5) הוכרע כי מדובר בהטרוזיגוט. במקרים בהם ב-3 חזרות על אותה דגימה
הוצג דגם הומוזיגוטי, נקבע כי מדובר בהומוזיגוט אמיתי. שני אתרים נוספים (Fca105 ו-Fca247) הציגו בגיל
דגם חלש שהקשה על פענוח התוצאות בו. גדלי האללים המופיעים עבור שני אתרים אלו (נספח ב) מוטלים
בספק רב. על מנת לאמת את תוצאות אלו יש לחזור על התגובה ואף להביא את האללים לידי ריצוף, על מנת
לגלות מהו גודל הרצף החוזרני באופן שיקל על קריאת התוצאות. לפיכך לא נעשה כל שימוש בתוצאות
האתרים הללו באנליזות הבאות.



איור 4- הופעתם של shadow-bands באתרי מיקרוסטליטים דינוקלאוטידיים Fca126 ו-Fca045.



איור 5- הומוזיגוטים כוזבים בתוצאות סריקת האתר המיקרוסטליטי F115. מרבית הדגימות מאוכלוסיית הבר הציגו דגם הטרוזיגוטי. דגימות 260 ו-266 שהציגו דגם הומוזיגוטי בהגברה ראשונה נבדקו פעמיים נוספות כל אחת והתגלו כהטרוזיגוטים.

תוצאות החלוקה של נמרי המוזיאון לגנוטיפים ייחודיים הראו כי שימוש בנתוני אללים מלאים משפר את מהימנות התוצאות. זיהוי וקיבוץ של גנוטיפים זהים שימושי בייחוד בדיגום לא-פולשני, שכן עשויות להופיע מספר דגימות שמקורן באותו פרט (Valiere, 2002). לפיכך הוכן קובץ קלט עבור תכנת GIMLET בו נתונים מלאים בלבד- כלומר מתוך 54 דגימות של נמרי הבר מופיעות בקובץ תוצאות של 41 דגימות ל-4 האתרים בהם תוצאות מלאות לכל אותן הדגימות. פלט התוכנה מחלק את הדגימות ל-9 קבוצות שונות המייצגות 9 גנוטיפים רב-אתריים ייחודיים (טבלה 3) הכוללים : 266 מקרים בהם שתי דגימות נבדלות זו מזו באלל אחד, 91 מקרים בהם דגימות נבדלות בשני אללים בשני אתרים שונים ו-3 מקרים בהם דגימות נבדלות בשני אללים באתר אחד.

בקובץ קלט אחר הוספו תוצאותיהם של שאר דגימות הנמרים לאותם 4 אתרים, הכוללות נתונים חסרים. פלט התוכנה מצא כי נוסף גנוטיפ ייחודי אחד הכולל דגימה אחת, כלומר 10 גנוטיפים ייחודיים בסך

הכל. תוספת של דגם גנוטיפי ייחודי נוסף על סמך דגימה אחת בלבד הכוללת נתונים חסרים אינה אמינה. בנוסף, בשל העובדה כי בדגימות שנוספו לאנליזה זו חסרים נתונים - מרבית הדגימות התאימו ליותר מדגם גנוטיפי אחד ומכאן שלא הועילו בחיזוק דגם גנוטיפי מסוים מבין אלו שנמצאו באנליזה הראשונה. לפיכך הוחלט לדבוק בחלוקה הראשונית ל-9 גנוטיפים.

טבלה 3- חלוקת 41 דגימות DNA מאוכלוסיית הבר לגנוטיפים רב-אתריים על סמך פלט תוכנת GIMLET.

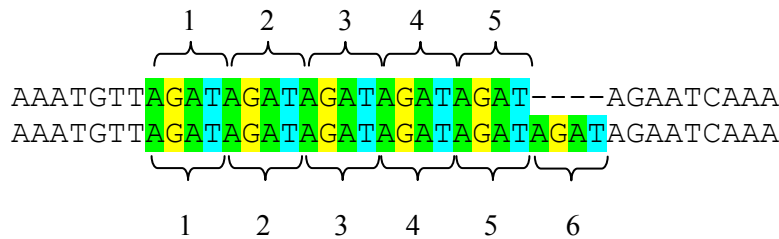
גנוטיפ מספר	מספרן הסידורי של דגימות ה-DNA	סה"כ דגימות
1	,223 ,215 ,214 ,213 ,212 ,202 ,201 ,198 ,193 ,188 ,148 ,70 ,i ,22 ,21 ,18 ,282 ,270 ,262 ,259 ,248 ,247 ,246 ,243 ,241 ,237 ,236 ,235 ,234	29
2	55	1
3	264 ,194 ,56	3
4	64	1
5	160 ,155 ,80	3
6	222	1
7	233	1
8	263	1
9	266	1

ריצוף אללים

הדרך הפשוטה ביותר לרצף שני אללים שונים (או יותר) לאתר מיקרוסטילטי אחד הינה איתור פרטים שמציגים דגם הומוזיגוטי לכל אחד מהאללים ושיבוט תוצרי PCR של כל אחד מהם בנפרד. בשניים מבין כלל האתרים בהם נתגלה פולימורפיזם (Fca453, F115) בוצע תהליך השיבוט במטרה לרצף את שני האללים לצורך קביעה מדויקת של גודלם ובחינת השונות במספר הרצפים החוזרניים.

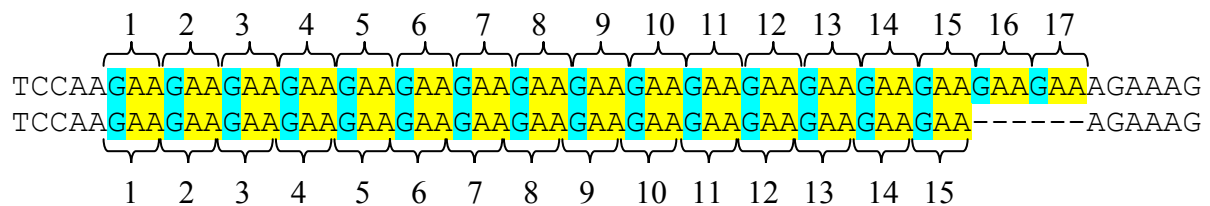
מאחר ובאתר F115 התגלו פרטים הומוזיגוטים רק לאלל אחד לא ניתן היה לרצף את האלל השני בדרך זו. לפיכך נעשה שימוש בתוצר PCR של פרט הטרוזיגוט המכיל את שני האללים, ועלה הצורך לבדד פלסמידים שקלטו אלל אחד מאלו שקלטו את האלל השני. באתר Fca453 אמנם נתגלו פרטים הומוזיגוטים לשני האללים אך במספר ניסיונות לערוך ליגציה של תוצרי PCR מדגימות אלו לא התקבלה התוצאה הרצויה, ככל הנראה בשל כמות תוצרים נמוכה מדי. לפיכך הוחלט לערוך ליגציה מדגימה הטרוזיגוטית המייצרת כמות גדולה מספיק של תוצרי PCR שתאפשר ליגציה טובה.

אתר Fca453 - לאחר ריצוף האללים של פרט הטרוזיגוט (202) לאתר נתקבלו שני רצפים באורכים שונים: 173 ו-177 נוקלאוטידים. מתוצאות עימוד שני הרצפים באמצעות תכנת ClustalX (איור 6) ניתן לראות כי הרצף החוזרני הינו טטרא-נוקלאוטיד וכי האלל הארוך מכיל חזרה אחת יותר מהאלל הקצר.



איור 6- אזור השונות ברצף האללים של פרט הטרוזיגוט לאתר Fca453.

אתר F115 - מעימוד הרצפים של שני האללים שנתקבלו משיבוט תוצר PCR מפרט הטרזיגוט (247; איור 7) נתקבלו שני רצפים באורכים שונים: 205 ו-211 נוקלאוטידים. נמצא כי הרצף החוזרני הינו טרי-נוקלאוטיד כשהאלל הארוך מכיל שתי חזרות יותר מהאלל הקצר.



איור 7- אזור השונות ברצף האללים של פרט הטרוזיגוט לאתר F115.

לאחר השלמת האנליזה באתר זה נתגלה כי אין מדובר באתר פולימורפי שכן פרטים שהציגו דגם הומוזיגוטי, התגלו כהטרוזיגוטים (איור 5).

MHC-SSCP 4.3.2

תהליך ההרצה של תוצרי PCR בג'ל בשיטת ה-SSCP אמור ליצור דגם בו נראים שני פסים בפרט הומוזיגוט ו-4 פסים בפרט הטרוזיגוט. מרבית דגימות ה-DNA הניבו תוצרים לזוג הפריימרים DRB219 ו-DRB61A בתגובת PCR, אולם מראה הפסים שהתקבל בג'ל הקשה על פענוח התוצאות. על אף שבג'ל אגרוז נראה היה כי נתקבל תוצר יחיד עבור כל פרט, מספר הפסים בג'ל ברוב המקרים היה שלושה ויותר, כך שלא ניתן היה לקבוע אלו פסים רצויים ואלו פסים מהווים תוצרי לוואי או אם פרט הוא הומוזיגוט או הטרוזיגוט. גם לאחר הרצת מיהולים שונים בג'ל לא נתקבל דגם ברור יותר. על אף זאת ניתן היה להבחין ב-3 דגמים שונים

של פסים (איור 8). מרבית הדגימות של אוכלוסיית הבר ענו לדגם אחד (דגם A) בעוד ארבעת הדגימות : 64, 160, 155, 80 יצרו דגם שונה (דגם B), המציג שלושה פסים נוספים. דגם ייחודי נוסף (דגם C) התקבל בדגימה 233 בלבד. על מנת לוודא כי מדובר בדגם נוסף בוצעה תגובת PCR נוספת ובהרצת התוצר בג'ל נתקבל אותו דגם.

מבין ארבע דגימות DNA מנמרי החי-בר שתיים לא הגיבו ו-2 יצרו דגם זהה ביניהם שהוא מעט שונה מזה של אוכלוסיית הבר (D). מבין דגימות ה-DNA שהופקו מעורות נמרים מהמוזיאון הזואולוגי הגיבו שני נמרים : ציה ואמרפל, שניהם בעלי דגם זהה לזה הנפוץ בקרב נמרי הבר (A).



איור 8- דגמי האללים לזוג הפריימרים DRB219 ו-DRB61A בטכניקת SSCP. דגם A- הינו הדגם השכיח באוכלוסיית הבר.

4.4 מבחן זכריות

PCR

הפריימרים SRY (Lyons *et al.*, 1997), UBEY ו-ZFY1F/ZF2R (Murphy *et al.*, 1999) עוצבו על פי רצפים של גנים על כרומוזום Y בחתול הבית (*Felis catus*). בתגובות PCR בהן נעשה שימוש בזוגות פריימרים אלו לא נתקבלו תוצרים עבור דגימות DNA של נמרים. רשימה ארוכה של רצפי פריימרים נבדקו באמצעות תכנת BLAST. רצף הנוקלאוטידים של הפריימר שימש שאילתא לחיפוש במאגר הרצפים GenBank. פלט התוכנה כלל רשימה של הרצפים הדומים ביותר לרצף השאילתא וכך ניתן היה לבחון את מידת הספציפיות של כל פריימר לכרומוזום Y, למשפחה ולמין. זוג הפריימרים δ ZfyF/Exon6R (Slattery *et al.*, 2000) נמצא כמתאים ביותר ונבחר לשמש לזיהוי זוויג. בתגובת PCR נתקבל מקטע באורך של ~900bp. תוצר זה רוצף

ובאמצעות תכנת BLAST נמצא כי נתקבל מקטע של הגן לחלבון אצבעות אבץ על כרומוזום Y (Zfy) בנמר. מכלל דגימות ה-DNA מנמרי הבר נתקבלו תוצרי PCR רק בהפקות שמספרן: 80, 155, 160, 188 ו-193. המשותף ל-5 ההפקות הוא כי מקורן בגללים שנמצאו טריים בשטח אשר לא נחשפו לפגעי הזמן והאקלים. סביר להניח כי איכות ה-DNA המופק מגללים אלו גבוהה מזו של DNA המופק מגללים ישנים ויבשים. ה-DNA המצוי בגללים ישנים לרוב מפורר למקטעים קצרים, ומכאן שהגברת מקטע קצר מעלה את הסבירות להימצאותה של תבנית (template) שלמה במסגרת רצף המטרה (Spong *et al.*, 2000). לפיכך הוחלט כי יש לכוון את הפריימרים כך שהמקטע המוגבר יהיה קצר יותר.

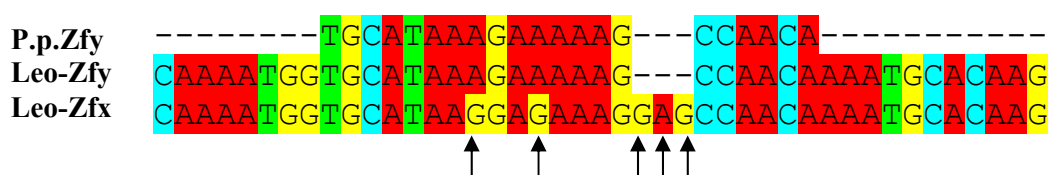
במאמר העוסק ביחס הזוויגים של נמרים שניצודו בטנזניה (Spong *et al.*, 2000) נערכה תגובת PCR המערבת שלושה פריימרים, האחד ספציפי לכרומוזום Y (ZFY1R), השני לכרומוזום X (ZFX1R) והשלישי כללי (ZF2F). דגם הפספוס שיוצרים התוצרים בג'ל אגרוז מאפשר הבדלה בין נקבות לזכרים, כאשר בזכרים מתקבל פס אחד נוסף. בתגובת PCR בתנאים המתוארים במאמר נתקבל דגם פספוס שונה מזה הצפוי ומרבית הדגימות לא הגיבו כלל. גם לאחר שינויים בתערובת הריאקציה ובתכנית ה-PCR לא נראה שיפור ולפיכך הוחלט כי יש לגביר את המקטע מכרומוזום Y בלבד על ידי שימוש בזוג הפריימרים ZF2F/ZFY1R. בתגובת PCR התקבלו שני תוצרים בגדלים של ~700bp ו-~300bp. על מנת להפטר מהתוצר הקטן בודד התוצר הגדול מתוך ג'ל אגרוז ונערכה הגברה נוספת מתוכו. בהגברה נתקבלו שוב שני התוצרים ומכאן הוסק כי התוצר הקטן מהווה חלק מרצף התוצר הגדול. מקטע של ~400bp רוצף ובאמצעות תכנת BLAST נמצא כי מהווה מקטע של הגן לחלבון אצבעות אבץ על כרומוזום Y (Zfy) בנמר. בתגובת PCR מרבית דגימות ה-DNA הניבו תוצרים אולם נתקבלו תוצרים גם מ-2 דגימות שהופקו מעורות של נקבות. מכאן שלא ניתן היה להתייחס לתוצאות כאמינות ועלה הצורך בפתרון אחר.

תגובת PCR המכוונת לכרומוזום X שימשה ביקורת לתגובות שזכרו. זוג הפריימרים (Murphy *et al.*, 1999) rps4XF/rps4XR הניב תוצרים במרבית דגימות ה-DNA (67%) של נמרים מהבר (נספח ג) על אף שצפוי היה שכל הדגימות יתנו תגובה חיובית.

Dot blotting

הפקות DNA מעורות נמרים שימשו בניסוי זה כביקורת שכן זוויג הנמר בהן ידוע בהן מראש (זאת במידה ואין שגיאות רישום במוזיאון, שכן קשה לזהות את זוויג הנמר על סמך מראה העור בלבד). בתגובות בהן נעשה שימוש בגלאים שהם תוצרי PCR לשני זוגות הפריימרים ZF2F/ZFY1R ו-δZfyF/Exon6R הגיבו

מרבית דגימות ה-DNA (76%) מנמרי הבר, אולם אלו כוללות תגובה חיובית של נקבות מקבוצת הביקורת. מאחר ופריימרים אלו ספציפיים לכרומוזום Y עלה החשש כי קיים דמיון גבוה בין רצף המקטע המוגבר בגן ZFY לרצף הגן ההומולוג ZFX. לפיכך נערך עימוד (pairwise-alignment) בין הרצפים של שני גנים אלו בנמרים (NCBI gi:9623229, gi:9623283) באמצעות התוכנה (NCBI) Blast2. הרצפים הראו 97% זהות ומכאן שרצף תוצרי ה-PCR ששימשו כגלאים בתהליך ההיברידיזציה לא היו ספציפיים מספיק לכרומוזום Y. תוצאות ניסוי זה, יכולות לשמש ביקורת בדומה לביקורת שכוונה לכרומוזום X בבדיקת הזוויג באמצעות תגובת PCR. כלומר, כל דגימות הנמרים אמורות לתת תגובה חיובית לגלאי זה, שכן הוא עובר היברידיזציה עם הגן על כרומוזום X ו-Y כאחד.



אוליגונוקלאוטיד P.p.Zfy הוזמן כשהוא כבר מסומן ב-Dig-oxygenin ושימש כגלאי, בדומה לגלאים הקודמים שסומנו באמצעות תגובת PCR. בטרם יושמה בדיקת הזוויג על דגימות ה-DNA מהבר, נעשה שימוש בדגימות מעורות המוזיאון על מנת לאמת את ספציפיות הגלאי לזכרים. כפי שניתן היה לצפות, לא נתקבלה תגובה חיובית בדגימות DNA שהופקו מעורות של נקבות אולם, בניגוד למצופה גם הדגימות שהופקו מעורות של זכרים לא הציגו תגובה חיובית. יתכן וכשל התגובה קשור באיכות הפקות ה-DNA, העשויה להיות מושפעת משיירים של חומרי הפיקסציה ששימשו לעיבוד העור. לפיכך, דגימות DNA מעורות

הנמרים לא יכלו לשמש ביקורת ועלה צורך לוודא כי נקבות אינן מגיבות לגלאי וכי פרטים שכבר זוהו כזכרים באמצעות PCR (80, 155, 160, 188 ו-193) אכן מגיבים באופן חיובי לסמן. לצורך כך הופקו דגימות DNA מגללים של שתי נקבות המתקיימות בגן החיות הלימודי בחיפה. רק לאחר שנמצא כי לא נוצרה היברידיזציה בין הגלאי לבין DNA של נקבות אלו ניתן היה לקבוע כי הסמן אמין. בהמשך יושמה התגובה על כלל דגימות ה-DNA מהבר ודגימות אשר לא הגיבו בפעם הראשונה נבחנו בתגובה נוספת על מנת לבדוק את אמינות התוצאה. 28 דגימות DNA (52%) מנמרי מהבר הגיבו באופן חיובי ומכאן שנקבע מקורן כזכרי. דגימות אלו כוללות את 5 הדגימות שזוהו כזכריות קודם לכן, באמצעות PCR.

26 דגימות נוספות נחלקות בין דגימות שמקורן בנקבות לבין דגימות בהן כשלה התגובה ובעקבות כך יתכן מצב בו לא נקבעה זכריות, על אף היותה תקפה. בטבלה בנספח ג מוצגות תוצאות ההיברידיזציה עם תוצרי PCR שלא הראו ספציפיות לזוויג (ZF2F/ZFY1R ו- δ ZfyF/Exon6R) ותוצאות הגברת PCR עם סמן ספציפי לכרומוזום X (Rps4x). ב-9 דגימות DNA (17%) לא התקבלה תגובה כלל או שהתקבלה תגובה עבור סמן אחד בלבד שאינו ספציפי לזוויג. בדגימות אלה נראה כי איכות ו/או כמות ה-DNA לא אפשרה הגברת PCR או היברידיזציה והן הוצאו ממניין הדגימות להן ניתן לייחס זוויג. 17 הדגימות (31%) אשר הגיבו באופן חיובי לפחות לשני סמנים שאינם ספציפיים לזוויג, ולא הגיבו עבור הסמן הספציפי לכרומוזום Y (P.p.Zfy) יכולות להיות מיוחסות לנקבות. בהסתמך על 44 הדגימות להן ניתן היה לייחס זוויג, אחוז הזכרים הוא 50 ואחוז הנקבות הוא 31, ומכאן שיחס הזוויגים בדגימות ה-DNA הוא 1.6 זכרים על כל נקבה. אולם אין להשליך מתוצאות אלו ליחס הזוויגים האמיתי באוכלוסיה או במדגם שכן יתכן וחלק מהפרטים מיוצגים על ידי דגימת DNA אחת בעוד אחרים מיוצגים על ידי מספר דגימות. יחס הזוויגים בין הפרטים שנדגמו יכול להיקבע רק לאחר הצלבת תוצאות אנליזה זו עם זו שנועדה לזהות פרטים.

4.5 הערכת גודל האוכלוסיה בבר

על מנת להימנע מקביעת אומדן המעריך ביתר את גודל האוכלוסיה, יש להשתמש במספר מינימלי של אתרים פולימורפיים בהם נעשו מאמצים למזעור שגיאות (Kohn *et al.*, 1999; Waits & Leberg, 2000). לפיכך, נעשה שימוש באותם 4 אתרים מיקרוסטילטיים בעלי האמינות הגבוהה ביותר ששימשו לקביעת מספר הגנוטיפים הייחודיים. שימוש בנתונים מדגימות DNA אשר הגבירו פרופורציה גבוהה של אתרים משפרת את מהימנות האומדן (Creel *et al.*, 2003) ולפיכך הוכן קובץ קלט הכולל את תוצאותיהן של 41 דגימות להן נתוני אללים מלאים לכל 4 האתרים. תוכנת GIMLET מאפשרת לעשות שימוש גם בדגימות

ואתרים בהם קיימות תוצאות חלקיות בלבד, כלומר ניתן לעשות שימוש בקובץ המכיל את תוצאות כל 54 דגימות ה-DNA לאותם אתרים מיקרוסטילטיים. אולם התוצאות הראו כי רמת הדיוק במצב זה יורדת בצורה דרמטית.

באמצעות תוכנת GIMLET יוצרו 3 קבצי קלט לתוכנת R, בהתאם ל-3 המשוואות - Holdridge, Chessel ו-Kohn - בהן נעשה שימוש לצורך חישוב אסימפטוטה (a) לעקומה, המהווה אומדן לגודל האוכלוסיה. רווח בר-סמך של 95% וערכי a מינימלי ומקסימלי נקבעו על סמך תוצאות של 1000 חזרות עבור כל משוואה (בטבלה 4).

טבלה 4- תוצאות האומדן לגודל אוכלוסיית נמרי הבר באמצעות Rarefaction-curve.

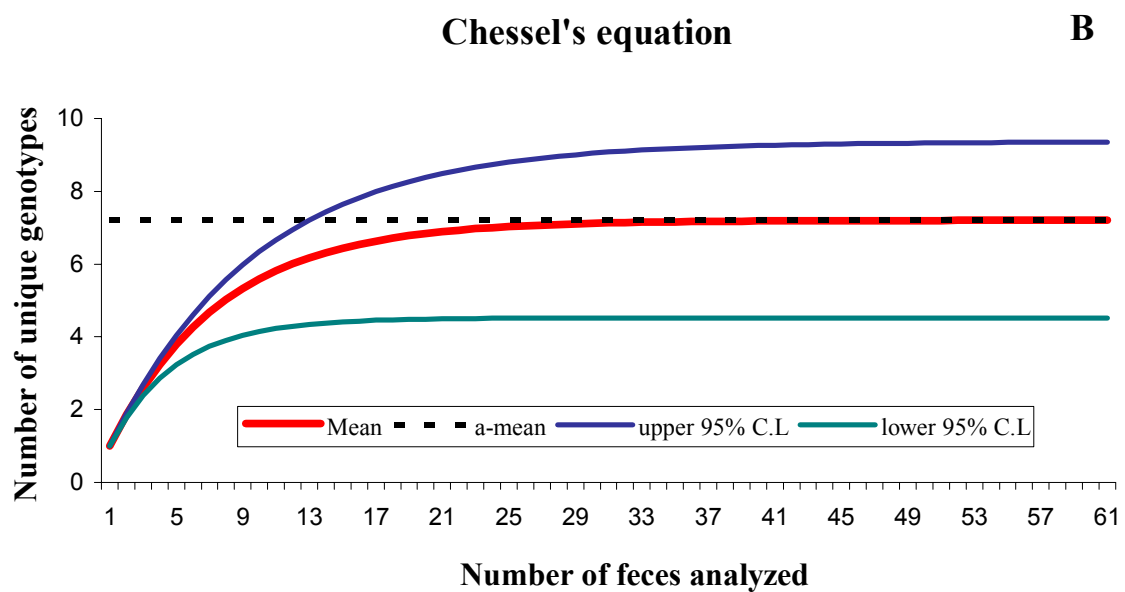
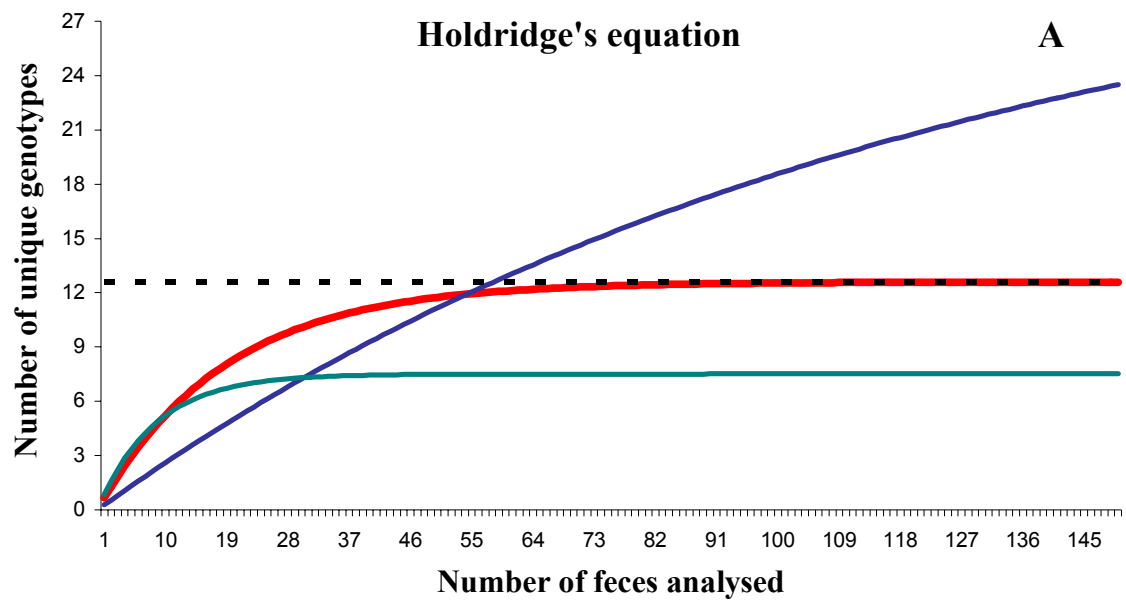
Chessel	Holdridge	Kohn	
7.23	12.6	21.96	a ממוצע
8.82	33.25	92.89	95% רווח בר-סמך עליון
5.28	7.51	9.2	95% רווח בר-סמך תחתון
0.90	10.34	41.64	סטיית תקן
4.52	6.53	7.21	a מינימלי
9.36	155.71	791.67	a מקסימלי

משוואת Kohn מעריכה כי ערכה הממוצע של האסימפטוטה (a) שווה 21.96 עם סטיית תקן גדולה מאוד שערכה כמעט כפול מערך הממוצע (41.6). כאשר בוצעה האנליזה מספר פעמים בהינתן אותם הנתונים, התקבלה ווריאציה גדולה מאוד בתוצאות, בעוד בשימוש בשתי המשוואות האחרות התקבלו תמיד תוצאות דומות ולפיכך לא מוצג גרף המתאר את תוצאה זו. משוואת Kohn נוטה להעריך ביתר את גודל האוכלוסיה, בייחוד כאשר ההסתברות של כל פרט להידגם אינה שווה (Valiere, 2003) אולם ניתן להפחית הטיה זו באמצעות הגדלת מאמצי הדיגום. Eggert *et al.* (2003) ערכו מבחן סימולציה לאומדן גודל אוכלוסיה תוך שימוש בנתונים סינתטיים. בשימוש במשוואת Kohn מצאו כי עבור אוכלוסיה של 75 פרטים, אנליזה של 125 דגימות מביאה להערכה כי האוכלוסיה כוללת 117 פרטים (156%) ובאנליזה של 250 דגימות התקבלו 99 פרטים (132%). בחלוקה לגנוטיפים ייחודיים ניתן לראות כי קיימים גנוטיפים שנדגמו מספר רב של פעמים בעוד אחרים נדגמו רק פעם אחת ומכאן ניתן היה לצפות מראש כי המשוואה תעריך ביתר את גודל האוכלוסיה. מאחר וגודל האוכלוסיה האמיתי קבוע, ברור כי סטיית התקן הגדולה נובעת מאופי הדיגום ומכאן שמוטב להשתמש במשוואה המושפעת מכך פחות.

בשימוש במשוואת Holdridge (איור 10A) ערך האסימפטוטה הממוצע שהתקבל הוא 12.6. ערך זה קטן בכ-10 פרטים בהשוואה למשוואה הקודמת. משוואת Holdridge מושפעת פחות מגודל המדגם ונותנת אומדן

טוב יותר אפילו כאשר גודל המדגם קטן מאוד בהשוואה לגודל האוכלוסיה (Eggert *et al.*, 2003). על מנת לבחון את השפעת גודל המדגם על התוצאות נעשה שימוש בקובץ קלט נוסף, הכולל את 54 דגימות ה-DNA לאותם 4 האתרים (ונתונים חסרים). ערכו הממוצע של a שהתקבל, 13.8, אינו שונה בהרבה מהתוצאה שהתקבלה עבור נתוני 41 הדגימות. עם זאת גם בהשוואה זו מתקבלת סטיית תקן שהיא גדולה מאוד ביחס לממוצע. כאשר בוצעה האנליזה מספר פעמים, נתקבלה לעיתים סטיית תקן שווה או אף גדולה מן הממוצע-דבר שמרמז על השפעה של חוסר האחידות במספר החזרות של הגנוטיפים השונים.

משוואת Chessel (איור 10B) מעריכה כי ערכו הממוצע של a שווה 7.2 וכי ערכו המקסימלי הוא 9.4 בעוד נתוני המקור כוללים 9 גנוטיפים ייחודיים. כלומר על פי משוואה זו 9 הגנוטיפים שנדגמו מהווים את הערכת המקסימום בעוד ניתן היה להניח כי קיימים גנוטיפים נוספים אשר לא נדגמו כלל וכי אלו שנדגמו מהווים דווקא את הערכת המינימום. נראה כי משוואה זו מושפעת פחות מחוסר האחידות שבדיגום שכן סטיית התקן קטנה באופן יחסי (0.9). לאחר הזנת הקובץ המכיל את תוצאות כל 54 הדגימות ל-4 האתרים נמצא כי הגדלת המדגם לא שינתה באופן משמעותי את האומדן: ערך האסימפטוטה הממוצע שהתקבל היה 7.23 עם סטיית תקן שערכה 0.92. כאשר חוזרים על האנליזה מספר פעמים מתקבלות תוצאות קבועות כלומר לא מתקיימות תנודות הממוצע האסימפטוטה או בסטיית התקן להבדיל מ-2 המשוואות הקודמות. מכאן מצטייר כי אמינות האומדן המתקבל על ידי משוואה קונסרבטיבית זו היא הגבוהה ביותר. בנוסף לכך, מאחר ומדובר באוכלוסיה על סף ההכחדה מוטב להשתמש באומדן זהיר ובלבד שלא יינתן אומדן המעריך ביתר את גודל האוכלוסיה ועשוי לגרור אחריו החלטות הרוות אסון.



איור 10 - אומדן גודל האוכלוסיה של נמרי הבר באמצעות אנליזת Rarefaction, תוך שימוש ב משוואת (A) Holdridge ו- (B) Chessel. הקו המקווקו מציג את ערך האסימפטוטה ל-a הממוצע.

5. דיון

5.1 מגבלות הדיגום הלא-פולשני (non-invasive) והשלכותיהן על תוצאות המחקר

דיגום לא-פולשני, להבדיל משיטות דיגום מסורתיות, מאפשר להשיג מידע אודות אוכלוסיות של בעלי חיים בעלי אורח חיים חמקני, בלא הצורך בתצפיות או בלכידת פרטים. עם פיתוח שיטת דיגום זו רווחה האמונה כי DNA ממקור לא-פולשני יוכל לספק מידע בדומה לזה המושג מדם או מרקמות (Taberlet *et al.*, 1999). עם זאת, איכותו של DNA ממקור לא-פולשני נמוכה בדרך כלל מבחינות שונות, למשל עקב היות ה-DNA מפורר למקטעים קצרים (Frantzen *et al.*, 1998) או בשל ריכוז נמוך של DNA ונוכחות של חומרים מעכבי PCR (Gagneux *et al.*, 1997; Kohn & Wayne, 1997). היתרון שבשיטת דיגום זו בולט בעיקר באנליזה של DNA מיטוכונדריאלי (mtDNA), המצוי במספר עותקים גדול בכל תא (10-2500). הגברת מקטעי mtDNA בתגובת PCR הינה פשוטה בשל הסיכוי הגבוה למצוא תבניות (templates) שלמות במסגרת רצף המטרה. בדרך זו ניתן לערוך אנליזה לצורך זיהוי של מינים (Reed *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 2000) וקביעת נוכחותם ותפוצתם בבר (Palomares *et al.*, 2002).

בעיות שקשורות באיכות דגימות ה-DNA באות לידי ביטוי בעיקר כאשר יעד ההגברה הוא DNA גרעיני (Bayes *et al.*, 2000), אשר חלקים ממנו מצויים בעותק אחד בלבד. מכאן ששלב הגברת הגן המיטוכונדריאלי מהווה תמרור אזהרה לגבי איכות הפקת ה-DNA (Lucchini *et al.*, 2002), שכן דגימה שלא הגיבה לפריימרים מיטוכונדריאליים, סיכוייה להגיב לפריימרים לגן גרעיני קטנים.

בעבודה הנוכחית הוגברו סמנים גרעיניים מיקרוסטיליטיים. גם במידה ונתקבלו תוצרי PCR ל-DNA גרעיני זה, עשוי להתקבל דגם פסים שאינו משקף את הגנוטיפ האמיתי של הפרט ועל ידי כך לגרור הסקת מסקנות שגויות (Taberlet & Waits, 1998). דגם פסים שגוי עשוי לנבוע משני גורמים כשהעיקרי שבהם הוא הופעתו של אלל אחד בלבד בעוד מדובר בפרט הטרוזיגוט לאתר (ADO - allelic dropout). מקור נוסף לשגיאה הינו הופעתו של אלל שני (או יותר) במקרה של פרט הומוזיגוט לאתר (FA - false allele), על פי רוב בשל שגיאות של ה-Taq פולימראז (Taberlet *et al.*, 1996; Valiere *et al.*, 2002). שגיאות אלו הן בעייתיות בייחוד לצורך אומדן של גודל אוכלוסיה שכן גנוטיפ רב-אתרי שמכיל טעות עשוי ליצור פרט חדש כוזב ("ghost-genotype"; Creel *et al.*, 2003). בהינתן שפרט אחד מיוצג במקרים מסוימים על ידי מספר דגימות, יתכן מצב שבו יתקבל יותר מגנוטיפ כוזב אחד, שיגדיל עוד יותר את הערכת היתר של גודל האוכלוסיה. מחקרים קודמים מעריכים כי שיעור השגיאות נע בין 0.001 ל-0.05 לאתר (Waits & Leberg, 2000). על מנת למזער שגיאות אלה הוצעה על ידי Taberlet *et al.* (1996) גישת ה-multiple tubes בה מוגברת כל דגימת DNA

מספר פעמים כנגד כל אתר באופן בלתי תלוי. על מנת לבצע עבודת מעבדה בשיטה זו נדרשים זמן רב ותקציב רחב.

תוצרי PCR של דגימות DNA שהגבירו את מקטע הגן המיטוכונדריאלי 16S במחקר זה נשלחו לריצוף ולצורך כך הוגברו לפחות פעמיים. דגימות DNA שאיכותן ירודה במיוחד לא הגיבו כלל והושמטו ממניין הדגימות עליהן יושמו אנליזות נוספות. ממחקרים קודמים ידוע כי איכות הפקות ה-DNA מושפעת מגיל הגלל (Lucchini *et al.*, 2002). מרבית הגללים שנמצאו בשטח המחקר היו יבשים אם בשל תנאי האקלים במדבר ואם בשל היותם ישנים. לפיכך כמויות ה-DNA אינן אחידות בין הפקה להפקה, בהתאם למצב בו נמצא הגלל. שתי הפקות DNA (80 ו-155) שמקורן ב-2 גללים טריים במיוחד הגיבו בקלות לכל הסמנים שנסקרו כנגדם (ראה נספח ב). הפקות אלה הן מן הבודדות שהניבו תוצרי PCR לזוג הפריימרים $\delta ZfyF/Exon6R$ התומכים בתוצר ארוך במיוחד בגודל של ~900bp.

באוכלוסיות קטנות העומדות בפני סכנת הכחדה, השלכותיהן של שגיאות המיוחסות לדיגום לא-פולשני יהיו חמורות במיוחד, אך לרוע המזל לרוב יהיה זה אופן הדיגום האפשרי היחיד. מאחר ואוכלוסיית המחקר שנבדקה בעבודה הנוכחית קטנה מאוד וסביר כי בין פרטים שונים קיימת קרבה משפחתית, נדרשה סריקה נרחבת של אתרים מיקרוסטליטיים עד אשר אותרו כאלה המציגים פולימורפיזם. היות וכמות ה-DNA בדגימות נמוכה, אתרים רבים יצרו בגיל הפוליאקרילאמיד דגם פסים שלא אפשר את פענוח התוצאות. בשל קשיים אלו הוחלט כי יש לשים דגש על סריקת מספר רחב ככל האפשר של אתרים במטרה לאתר כמה שיותר אתרים המציגים דגם קריא ואינפורמטיבי. יישום של גישת ה-multiple tube על כלל אתרי המיקרוסטליטים היה אמנם מאפשר להגיע לתוצאות שאמינותן גבוהה, אך במקביל היתה מתאפשרת סריקת מספר מועט של אתרים (לפחות פי שלוש) ובמצב כזה סביר שמספר האתרים הפולימורפיים שהיו מאותרים היה קטן מדי. בנוסף, במחקרם של Taberlet *et al.* (1997) רק 21 מתוך 105 הפקות מגללי דובים הניבו כמות מספקת של DNA ליישום גישת ה-multiple tube. השימוש בגישה זו קריטי בייחוד כאשר ישנם אתרים פולימורפיים רבים בהם מספר גדול של אללים ו/או כאשר דגימות רבות מציגות דגם הומוזיגוטי. עם זאת, במחקר זה כמות האתרים הפולימורפיים קטנה מאוד, כאשר כל אתר שכזה הציג לכל היותר שלושה אללים. מכאן שנדרשה פשרה סבירה בין מספר האתרים הנסרקים לבין מספר החזרות והוחלט לסרוק מספר גדול של אתרים בשיטה המסורתית על מנת לאתר מספר רב ככל האפשר של אתרים פולימורפיים. באתרים בהם נתגלה פולימורפיזם ותוצאות הניתנות לפענוח בגיל הושקעו מאמצים נוספים על מנת לאתר שגיאות פוטנציאליות כגון ADO ו-FA. כך נבררו 4 האתרים: Fca096, Fca223, Fca453 ו-Fca391, עליהם יושמו בהמשך בדיקות ברמת האוכלוסיה והפרט. בדגימות אשר הציגו דגם הומוזיגוטי נערך וידוא כי אין

מדובר בהומוזיגוט כוזב כתוצאה מ-ADO. במקרים בהם הציגה דגימה אלל חדש שלא הוצג על ידי אף פרט אחר באוכלוסיה נערך וידוא על ידי הגברה חוזרת ובלתי תלויה. לפיכך רק ב-4 אתרים אלו קיימת סבירות נמוכה לשגיאות. במידה והיו נערכות בדיקות מסוג זה גם עבור שאר האתרים שנבחנו, מוטב היה להסיק מסקנות ברמת האוכלוסיה על סמך מספר רחב יותר של אתרים. אולם, בהינתן שמתוך 9 האתרים בהם לא נעשה שימוש- 7 מציגים דגם מונומורפי וב-2 הנותרים מהימנות פענוח התוצאות אינה גבוהה מספיק, השימוש הזהיר במספר קטן של אתרים משפר את הסיכוי להימנע מטעויות (Kohn *et al.*, 1999; Waits & Leberg, 2000; Waits *et al.*, 2001; Creel *et al.*, 2003).

5.2 זיהוי אינדיבידואלי

5.2.1 נמרי מוזיאון- ביקורת לכושר ההפרדה בין פרטים

עורות ורקמות משומרים המוחזקים במוזיאונים מהווים מקור חשוב ל-DNA ממנו ניתן להפיק מידע היסטורי יקר ערך אודות מינים שונים. הידרדרות של מין הינה מושג יחסי ועל מנת לזהות אותה דרוש מידע על מצב האוכלוסיה בעבר לצורך השוואה (Shaffer *et al.*, 1998). נמרי המוזיאון מהם הופק DNA אינם מייצגים יחדיו אוכלוסיה, שכן כל פרט מייצג תקופה שונה בעבר. מכאן שהמסקנות אותן ניתן להסיק מנתוני אנליזה זו הינן ברמת הפרט בלבד.

אנליזה של 7 אתרים מיקרוסטילטיים חשפה זהות מוחלטת בגדלי האללים בנמרות תיהמת וציה. רק באתר Fca391 נתגלה פולימורפיזם שאפשר לקבוע כי מדובר בשני פרטים שונים. לעובדה זו השלכות חשובות על התוצאות של אוכלוסיית הבר שכן ציה מקורה בנגב ותייהמת מקורה במדבר יהודה ועל אף שהאחת מתה בשנת 1986 והשניה ב-1998, בהתאמה, הן מציגות בדיוק את אותם האללים בכל שבעת האתרים. מכאן שקיימת סבירות גבוהה לכך שהערכה של מספר הפרטים באוכלוסיית הבר, מנתונים של 4 אתרים בלבד, תגרוור אומדן חסר. תוצאות אלה יכולות בנוסף לרמז על האפשרות של הגירה של פרטים בין תת האוכלוסיות כך שלא נוצר מצב של קיבוע של אללים שונים בכל תת אוכלוסיה. בטורפים המציגים שיעורי נדידה גבוהים למרחקים גדולים, שיעור העברת גנים (gene-flow) בין אוכלוסיות גבוה, בהינתן שהפרטים הנודדים מסוגלים להתרבות. לפיכך, במינים בעלי ניידות גבוהה ההבדלים הגנטיים בין אוכלוסיות נוטים להיות קטנים בייחוד אם הסלקציה אינה חזקה (Wayne & Koepeli reviewed in Gittleman, 1996).

ארבעת הנמרות שנבחנו אכלסו את שטח המחקר בתקופות שונות. הנמרה N7 היא הותיקה מכולן וישנו פער של 22 שנה בין שנת מותה לבין שנת מותה של תיהמת, הותיקה מבין שלושת הנמרות האחרות. שונות

גנטית נמדדת לרוב על ידי רמות הפולימורפיזם וההטרוזיגוטיות (Merola, 1994). העובדה כי הנמרה N7 מציגה מצב הטרוזיגוטי בחמישה אתרים מתוך שמונה, בעוד 3 הנמרות האחרות מציגות רק אתר הטרוזיגוטי אחד כל אחת, עשויה לרמז על שלב של צוואר בקבוק שגרם לירידה בשונות הגנטית.

5.2.2 נמרי הבר

אנליזת האתרים המיקרוסטליטיים יצרה חלוקה ל-9 גנוטיפים רב-אתריים ייחודיים הנסמכת על תוצאותיהן של 41 דגימות DNA ב-4 אתרים מיקרוסטליטיים פולימורפיים. במחקר זה ניכרה שונות גדולה במספר הדגימות המייצגות כל גנוטיפ, בעיקר בהשפעת שיטת הדיגום. באזור שמורת עין גדי, לדוגמא, מאמצי הדיגום היו גדולים בהשוואה לאתרים אחרים מאחר ונערך איסוף שיטתי של גללים על ידי פקחי השמורה. לפיכך הגנוטיפ השכיח באזור זה מיוצג על ידי 29 דגימות בעוד שגנוטיפים אחרים מאזורים בהם מאמצי הדיגום נמוכים יותר, מיוצגים על ידי דגימה אחת בלבד. מאחר וסימון בגללים מהווה אמצעי תקשורת בין פרטים, פיזורן של חפירות עם גללים בשטח אינו אקראי. הדיגום לאורכם של שבילים מגדיל את הסיכוי לדגום את אותו הפרט מספר פעמים, בשל נטייתם של נמרים לשוטט על פני שבילים קיימים (Bailey, 1993; Kohn & Wayne, 1997). בדומה לכך, פרטים שמרחקי השיטוט שלהם גדולים יותר עשויים להידגם יותר (Eggert *et al.*, 2003). השפעה נוספת לשיעורי דיגום שונים בין פרטים עשויה להיות תוצאה של זווית הפרט (Kohn *et al.*, 1999) או של מעמדו החברתי. לפי ממצאי תמנה (2000) זכרים מסמנים בגללים יותר מאשר נקבות, אולם בתקופת הייחום מסמנות נקבות יותר מזכרים. לעומת זאת, בתקופת הטיפול בגורים נוטות הנקבות לכסות את גלליהן בעפר, כך שיהיה קשה להבחין בהם או להריחם. נמרים צעירים שטרם הגדירו את שטחי המחיה שלהם, נוטים לסמן מעט אם בכלל את השטחים על פניהם הם עוברים (Bailey, 1993).

מתוך 9 הגנוטיפים שנקבעו, 6 מבוססים על דגימת DNA אחת בלבד ולפיכך בהנחה שהתוצאות מהימנות מדובר ב-6 פרטים שנדגמו פעם אחת כל אחד. על אף שכל דגימה שהציגה גנוטיפ ייחודי נבדקה מספר פעמים ייתכן בכל זאת כי קיימות בתוצאות שגיאות שנובעות מאיכותן של הפקות ה-DNA. כך למשל, גנוטיפ מספר 6 המיוצג על ידי הדגימה שמספרה 222 מייצג פרט שנדגם בעין גדי. כאמור, מאמצי הדיגום באתר זה היו גבוהים במיוחד ולכן הסבירות לכך שפרט מסוים נדגם שם רק פעם אחת נמוכה מאוד. כמו כן, נבדלת דגימה זו משאר הדגימות שמייצגות את אזור עין גדי באתר Fca453 בלבד. הדגימה מציגה מצב הומוזיגוטי לאתר בעוד שאר הדגימות מהאזור (גנוטיפ מספר 1) הן הטרוזיגוטיות לאתר. הבדל זה יכול לנבוע מתופעת ה-ADO, בה אלל אחד מושמט ואינו מוגבר בתגובת PCR. על אף שנערכו 2 חזרות נוספות על ההגברה, שגם

בהן התקבל דגם הומוזיגוטי לאתר, יתכן שמדובר בשגיאת PCR וכי גנוטיפ זה אינו אלא גנוטיפ כוזב. עם זאת, אין לפסול גנוטיפ זה על סמך תוצאות אלו בלבד. בדומה לכך, הדגימה שמספרה 55 המייצגת את גנוטיפ מספר 2 נבדלת מגנוטיפ מספר 1 באתר Fca391 בלבד. באתר זה מציגה הדגימה דגם הומוזיגוטי בעוד גנוטיפ מספר 1 מציג דגם הטרוזיגוטי לאתר ולכן קיימת האפשרות, אם כי בסבירות לא גבוהה, כי מדובר במקרה דומה של ADO. דגימה מספר 64 המייצגת את גנוטיפ מספר 4 אמנם מציגה שונות באתר אחד בלבד, אך במקרה זה מדובר באתר Fca096, בו מציגות מרבית הדגימות דגם הומוזיגוטי בעוד בדגימה 64 קיים אלל נוסף. גם תופעה זו יכולה להיות מוסברת כשגיאת PCR (PCR-slippage) והופעתו של אלל שני כוזב (false-allele) על אף שהפרט הוא הומוזיגוט (Hughes, 1992). על פי Taberlet *et al.* (1996) יש לחשוד באלל שקטן מן האלל העיקרי בחזרה אחת. עם זאת, בדגימה 64 גודל האלל העיקרי הוא 210bp וזה של האלל הנוסף 202bp, כלומר אללים אלו נבדלים במספר רצפים חוזרניים גבוה מאחד. מאחר ותופעת ה-FA מיוחסת לשגיאה של ה-Taq פולימראז (Valiere *et al.*, 2002) לא סביר שבהגברות חוזרות יתקבל בדיוק אותו אלל. לפיכך מאחר ובהגברות נשנות התקבל אלל בגודל זהה ובהתחשב בסבירות הנמוכה ל-ADO עקבי בכל הדגימות האחרות, ניתן לקבל את העובדה שדגימה מספר 64 מייצגת לבדה את גנוטיפ מספר 4. העובדה שהמקום בו נמצאה דגימה זו נדגם רק פעם אחת מחזקת מסקנה זו.

שלושה גנוטיפים ייחודיים נוספים (7, 8, 9) המיוצגים על ידי דגימת DNA אחת בלבד (233, 263 ו-266 בהתאמה) מציגים שונות בשני אתרים כל אחד. במצב זה סביר פחות שהשונות בדגימות נובעת משגיאות של PCR שכן היא מוצגת ב-2 אתרים שונים ובלתי תלויים גם לאחר חזרה על התגובה. לפיכך ניתן להתייחס ל-3 גנוטיפים אלו כאל מייצגים של 3 פרטים שנדגמו פעם אחת בלבד כל אחד. לסיכום, מתוך 9 הגנוטיפים הייחודיים קיימים 2 בהם מוטל ספק ו-7 גנוטיפים שמהימנותם גבוהה יחסית.

תוצאות אנליזת ה-MHC-SSCP לא הוסיפו מידע רב על זה שהתקבל מתוצאות אנליזת המיקרוסטליטים, אך יש בהן כדי לחזק אותן. הדגימות שמספרן 64, 80, 155, 160 יצרו דגם ייחודי (B) הנבדל משאר דגימות ה-DNA שהציגו דגם אחר (A). בדומה לכך, נבדלו 4 דגימות אלה משאר הדגימות באוכלוסיה באנליזת המיקרוסטליטים אך יוצגו על ידי שני גנוטיפים נבדלים. גנוטיפ מספר 5 בתוצאות המיקרוסטליטים כולל את הדגימות שמספרן 80, 155 ו-160 ואילו דגימה 64 מייצגת את גנוטיפ מספר 4. כלומר, אנליזת המיקרוסטליטים במקרה זה אינפורמטיבית יותר מאחר ומייצרת תת חלוקה נוספת. העובדה כי דגימה 233 מייצגת דגם שלישי וייחודי באנליזת ה-SSCP (C) מחזקת את ממצאי המיקרוסטליטים- גם שם הציגה הדגימה גנוטיפ ייחודי (גנוטיפ 7) אשר לא הוצג על ידי אף דגימה אחרת.

5.2.3 זיווג של הנמרים ופיזורם הגיאוגרפי- הגדלת כושר ההפרדה בין פרטים

בשל אילוצים טכניים, הבדיקה שנועדה לזהות את זיווג הנמר כוונה לכרומוזום Y ומכאן שתוצאה חיובית אפשרה לקבוע בוודאות כמעט מוחלטת מקור זכרי לדגימת DNA, בעוד שקביעת נקביות נעשתה בדרך של אלימינציה. לו ניתן היה להשתמש בסמן מולקולרי המכוון אל יעד שקיים אך ורק בנקבות, היתה מהימנות התוצאות גבוהה יותר. על מנת להימנע מקביעת היותה של דגימה ממקור נקבי בשוגג, נערכה השוואה בין היענותן של דגימות לסמנים המכוונים לשני כרומוזומי המין. השוואה זו אפשרה להבדיל בין דגימות שלא הגיבו לסמן הזכרי בשל היותן ממקור נקבי לבין דגימות שלא הגיבו לסמן הזכרי בשל איכות ירודה של הפקת ה-DNA, שהתבטאה גם בחוסר היענות לסמן שאינו ספציפי לזיווג או בתגובה לסמן אחד בלבד מבין השלושה.

איחוד תוצאות החלוקה של דגימות ה-DNA לגנוטיפים ייחודיים עם מבחן הזיווג (טבלה 5) חשף חלוקה לשתי תת קבוצות תחת גנוטיפ מספר 1. תת-קבוצה אחת (1א'-ב') הכוללת 13 דגימות שזוהה מקורן הנקבי ותת-קבוצה נוספת (1ג') הכוללת 16 דגימות בהן זוהה זיווג הנמר כזכרי. מכאן שגנוטיפ מספר אחד כולל שני פרטים- זכר ונקבה. כאשר מביאים בחשבון גם את פיזורם הגיאוגרפי של האתרים בהם נאספו הדגימות, מוצאים שתת-הקבוצה הראשונה מכילה תת-חלוקה נוספת על פי שני אזורי הדיגום השונים: הר הנגב (1א') לעומת מדבר יהודה (1ב'). ארבעה מן הגללים המשתייכים לשתי תת קבוצות אלו נדגמו לסירוגין במדבר יהודה ובהר הנגב בטווח של 6 חודשים. לאור המרחק הרב בין אזורי הדיגום (כ-250 ק"מ) והעובדה כי נמרות נעות בממוצע 4.2 ק"מ ביממה (תמנה, 2000), לא סביר שנקבה אחת עברה מרחק זה 3 פעמים במהלך 6 חודשים. בנוסף הראו Mitzutani & Jewell (1998) כי נקבות אינן נעות למרחקים גדולים ונוטות להשקיע את מינימום האנרגיה הדרושה לצורך השגת טרף. אמנם אין הכרח כי תאריך איסוף הגלל קרוב למועד הטלתו, אך עקבת נמר שנמצאה בסמוך לגלל שנאסף בהר הנגב (דגימה 270) העידה על טריות הגלל. בנוסף, האתר במדבר יהודה בו נמצאו כל הגללים המיוחסים לגנוטיפ 1ב' נסרק בתכיפות גבוהה ולפיכך סביר שמועד איסוף הגללים בו סמוך למועד הטלתם. לסיכום, גנוטיפ מספר 1 מייצג ככל הנראה שלושה פרטים: זכר שנדגם ב-5 אתרים שונים באזור מדבר יהודה; נקבה שנדגמה מספר פעמים באתר אחד במדבר יהודה ונקבה נוספת שנדגמה ב-3 אתרים שונים בהר הנגב. ללא תוספת המידע לגבי זיווג הנמר והפיזור הגיאוגרפי של הדגימות המייצגות אותו, לא ניתן היה להבחין בין 3 הפרטים שנידונו. פרטים אלו הציגו זהות גנטית מוחלטת לכל 11 האתרים המיקרוסטליטיים שנבחנו. תוצאה זו עשויה לרמז על קיומם של זיווגי שארים באוכלוסייה. מאחר ורק 4 אתרים מיקרוסטליטיים הציגו פולימורפיזם, הכולל 2-3 אללים לאתר בלבד, הסבירות למציאת זהות מוחלטת בין פרטים באוכלוסייה קטנה זו גדול מאוד. מצב דומה מתואר במחקרם

של Woods *et al.* (1999) על אוכלוסיות דובים קטנות. לאחר ביצוע מחקר גנטי אודות האוכלוסיה באמצעים לא-פולשניים, נלכדו שני פרטים מהטבע. כאשר נסרק ה-DNA של שני דובים אלו כנגד כל האתרים המיקרוסטליטיים ששימשו לצורך חקר האוכלוסיה, נמצאה זהות גנטית מוחלטת בין שני הפרטים.

ב-2 דגימות מאוכלוסיית הבר לא זוהה זוויג הנמר. דגימה 259 נאספה באזור הר הנגב, באותו נחל ובאותו תאריך בו נאספה דגימה 262- ולפיכך ניתן להניח שמדובר באותו פרט, המשויד לקבוצה א'. דגימה מספר 234 נאספה באותו אזור ובאותו תאריך בו נאספו הדגימות שמספרן 235, 236 ו-237 ולפיכך סביר שמדובר באותו פרט המשויד לקבוצה ב'.

בדגימות שמספרן 55 ו-222 הועלתה הסברה כי חלה שגיאת PCR שהביאה להתבדלותם כגנוטיפים ייחודיים וכי סביר שהדגם הגנוטיפי האמיתי שלהם הוא זה של גנוטיפ מספר 1. לאחר ייחוס הזוויג לכל גנוטיפ, ניתן לראות כי הסברה מתיישבת היטב עם הזוויגים שיוחסו לתתי הקבוצות תחת גנוטיפ מספר 1. בקבוצה א' נכללות אך ורק דגימות מהר הנגב- שלוש מהן זוהו כנקבות. דגימה 55 אף היא מן הנגב וגם לה יוחס זוויג נקי- לפיכך סביר כי היא משתייכת לגנוטיפ 1א'. דגימה 222 נאספה בדיוק באותו אזור במדבר יהודה כמו כלל הדגימות המייצגות את גנוטיפ 1ב'- ומכאן שסביר להניח כי היא משתייכת לקבוצה זו. בדגימה שמספרה 266, המייצגת לבדה את גנוטיפ מספר 9, לא זוהה הזוויג. מאחר ואין דגימות נוספות תחת גנוטיפ זה נותר זוויג הנמר עלום. העובדה כי דגימה זו הגיבה אך ורק לסמן אחד במבחן הזוויג מעידה על איכות נמוכה של הפקת ה-DNA. עובדה זו עשויה לרמוז על אפשרות של שגיאות PCR בעקבותיהן נבדלה הדגימה באופן שיצר גנוטיפ ייחודי חדש. לפיכך, קיימת אי וודאות מסוימת בקשר למהימנותו של גנוטיפ זה. הנתונים המופיעים בטבלה 5 הועלו על מפת GIS (איור 11) במטרה להמחיש את פיזורם הגיאוגרפי של הפרטים השונים. על מנת למנוע שגיאות, הוזנו אך ורק נתונים של נמרים בהם זוהה הגנוטיפ והזוויג. ניתן לראות כי במדבר יהודה נדגם הזכר במספר אתרים, מצפון ועד לדרומו של ים המלח, בעוד הנקבה נדגמה באתר אחד בלבד. באזור הר הנגב מיוצג כל פרט על ידי מספר מועט של דגימות- באופן שממחיש את הקושי שבדיגום ובאיתור גללים באזור. הזכר המשויד לגנוטיפ מספר 5 נדגם במערב הנגב וגם בערבה. מאחר ומפרידים כ-5 חודשים בין מועדי הדיגום בשני האזורים, ולאור העובדה שזכרים נוטים לשוטט למרחקים ארוכים, יתכן שאכן מדובר בפרט אחד. בנוסף, בסקר נמרים שנערך על ידי רשות הטבע והגנים (שלמון, 1997) נמצא כי זכר שמרכז פעילותו הוא הר הנגב עורך לעיתים גיחות עד לצפון הערבה, והוערך כי תחום מחייתו משתרע על כ-150 קילומטרים.

תוצאות ריצוף האללים מחזקות את ההשערה כי קיימת האפשרות שגנוטיפים 2 ו-6 הינם גנוטיפים כוזבים. הדגימות המייצגות גנוטיפים אלו הציגו דגם הומוזיגוטי באתר אחד ובכך נבדלות מן הדגם המייצג את גנוטיפ מספר 1. באתר F115 הופיעו 2 דגימות (260, 266) שהציגו דגם הומוזיגוטי לאחד מבין שני

האללים לאתר. לאחר מספר הגברות חוזרות של דגימות ההומוזיגוטים נמצא כי האתר אינו מציג פולימורפיזם כלל בקרב אוכלוסיית המדגם והובהר כי בדגימות שהציגו דגם הומוזיגוטי חלה שגיאת PCR. בדגימות אלה הושמט אלל ובפועל היו אלה פרטים הטרוזיגוטים. ניתן לראות (נספח ב) ששתי דגימות אלה אינן מהוות חלק מ-41 הדגימות עליהן יושמו מרבית האנליזות, שכן הן לא נתנו תוצאות מלאות ל-4 האתרים המיקרוסטילטיים שנבחרו. לסיכום, ניתן לראות כי הפקות DNA בעלות איכות ירודה אינן מגבירות בעקביות לכל אתר ואתר וכי הן מועדות לשגיאות PCR, העשויות להטות את תוצאות המחקר. כמות התוצרים הנמוכה בריאקציות בהן הוגברו דגימות מפרטים הומוזיגוטים עשויה לרמוז על הפרעה בריאקציה ה-PCR ומכאן שקיימת האפשרות שהאלל השני לא קבל ביטוי על אף שהוא קיים. הסבירות לכך שפרטים שהציגו דגם הומוזיגוטי לאתר Fca453 סבלו משגיאה זו אינה גדולה. דגימות שהציגו דגם הומוזיגוטי הציגו דגם זהה גם לאחר הגברות חוזרות ונשנות. בנוסף, דגימות ששימשו לאנליזות נוספות הן דגימות שהגיבו בעקביות לכל 4 האתרים המיקרוסטילטיים ומכאן שאיכותן טובה ולכן גם מהימנות תוצאות ההגברה.

טבלה 5- שילוב של תוצאות החלוקה לגנוטיפים ייחודיים, זיהוי הזויג והפיזור הגיאוגרפי. סימון (*) מייצג דגימות בהן לא זוהה הזויג ולפיכך מיוחס להן הזויג על פי שאר הדגימות בקבוצה.

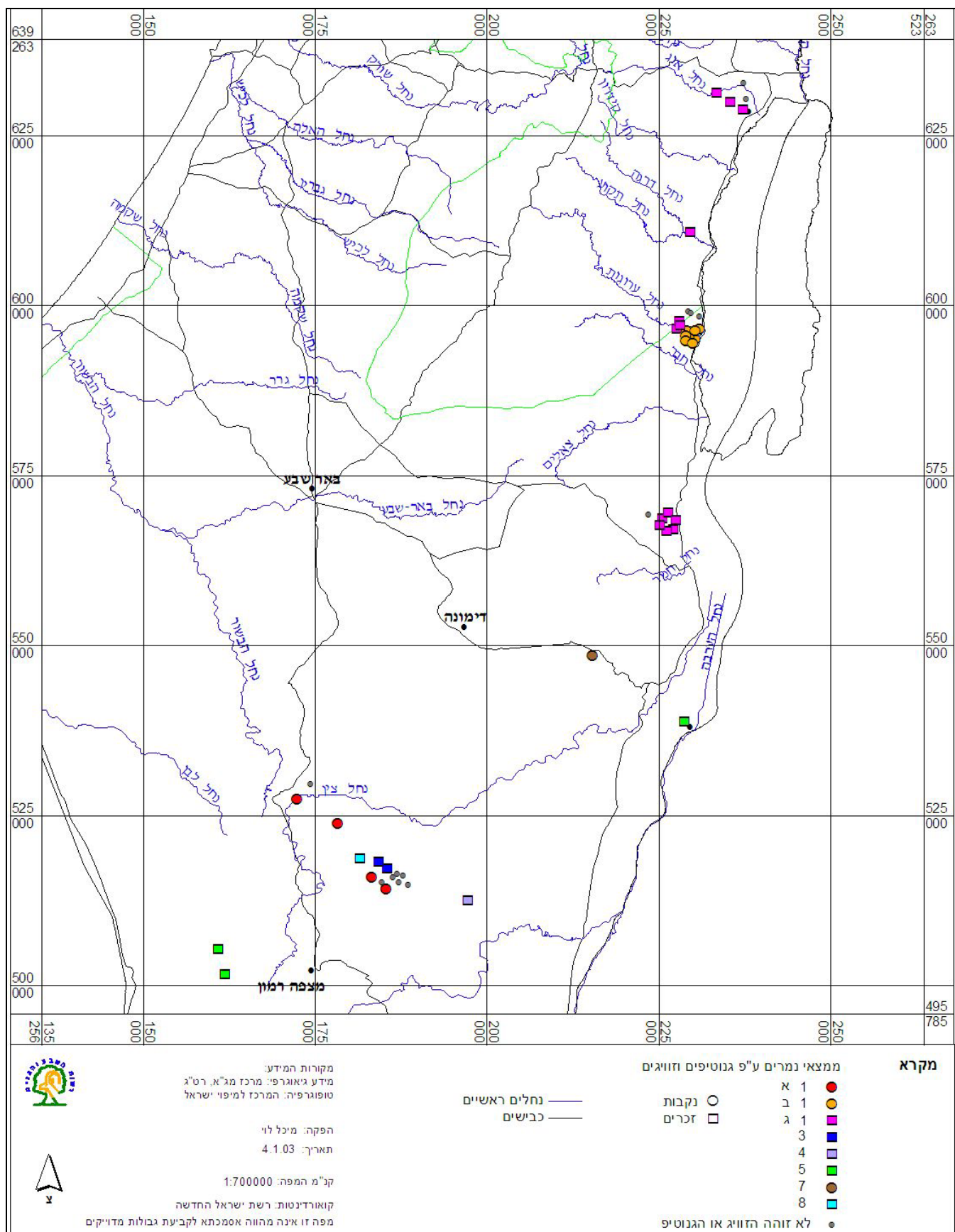
גנוטיפ	תת חלוקה	מספרי הדגימות	זויג	אזור הדיגום
1	א	259, 202, (*) 270, 262	נקבה	נגב
	ב	237, 236, 235, (*) 234, 70, i, 22, 21, 18	נקבה	מ. יהודה
	ג	214, 213, 212, 201, 198, 193, 188, 148, 282, 248, 247, 246, 243, 241, 223, 215	זכר	מ. יהודה
2 (א1')	א	55	נקבה	נגב
3	א	264, (*) 194, (*) 56	זכר	נגב
4	א	64	זכר	נגב
5	א	160, 155, 80	זכר	נגב, ערבה
6 (ב1')	א	222	נקבה	מ. יהודה
7	א	233	נקבה	ערבה
8	א	263	זכר	נגב
9	א	(*) 266	?	נגב

5.3 אומדן גודל האוכלוסייה בבר

לאחר שילוב בין תוצאות האנליזות המולקולריות השונות, בהסתמך על 4 אתרים מיקרוסטילטיים ו-41 דגימות DNA, מסתמן כי במדגם מיוצגים 9 פרטים על ידי 7 גנוטיפים. במדבר יהודה אותרו 2 פרטים, זכר

ונקבה ובאזור הר הנגב והערבה אותרו 7 פרטים : 2 נקבות, 4 זכרים ופרט נוסף (מוטל בספק) שזוויגו אינו ידוע.

אנליזה אסימפטוטית מניחה כי הפיזור המרחבי של פרטים הינו אקראי, בעוד באוכלוסיות טבעיות לרוב אין זה כך (Waits & Leberg, 2000; Eggert *et al.*, 2003). מכאן שההטרוגניות במספר הדגימות המייצגות כל גנוטיפ עשויה לגרום להטיה שלילית של האומדן לגודל האוכלוסיה. בהערכת גודל האוכלוסיה באמצעות משוואת Chessel התקבלה הערכה כי קיימים 7 פרטים (עם רווח בר-סמך 95% של 5-9 פרטים). באוכלוסיה גדולה ובעלת שונות גבוהה הסבירות לכך שכל גנוטיפ רב-אתרי ייצג פרט אחד היא גדולה, בייחוד אם הוא נסמך על מספר גדול של אתרים. אולם באוכלוסיות קטנות בהן מוצגת שונות גנטית נמוכה, לא די ב-4 אתרי מיקרוסטליטים על מנת לחשוף את כל ההבדלים בין הפרטים השונים. משוואת האומדן לגודל האוכלוסיה אינו לוקחת בחשבון את האפשרות שגנוטיפ אחד יכול לייצג יותר מפרט אחד ולפיכך מעריכה המשוואה כי האוכלוסיה מיוצגת על ידי 7 גנוטיפים ולא על ידי 7 פרטים. תוצאה זו מתיישבת עם ניתוח החלוקה לגנוטיפים ייחודיים של תוצאות המיקרוסטליטים, בו הוסק כי קיימים 7 גנוטיפים שמהימנותם גבוהה ושניים נוספים (2 ו-6) המוטלים בספק. עם זאת צפוי היה שמספר הגנוטיפים שהתקבלו יהווה הערכת מינימום (Creel *et al.*, 2003) ולא יהיה זהה לערכו הממוצע של a.



איור 11- פיזורם הגיאוגרפי של הנמרים בהתאם לחלוקה לגנוטיפים ומבחן הזויג.

על מנת לבחון את כושרם של סמנים מולקולריים להבדיל בין פרטים שונים ניתן להשתמש במעריך שנקרא (PI; Valiere, 2003) Probability of identity. מעריך זה בוחן את שונות האתרים שנבדקו ואת ההסתברות לכך ששני פרטים שנדגמו באקראי מאוכלוסיה יציגו גנוטיפ רב-אתרי זהה (Paetkau & Strobeck, 1994). החישוב נעשה על סמך תדירויות אללים והוא מניח זיווגי אקראי. הנחה נוספת הינה שאפילו אם חלק מהאתרים נמצאים בתאחיזה, הרי שהם במצב של שווי משקל (linkage equilibrium; Paetkau *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1997).

הערכת גודל אוכלוסיה הנסמכת על נתוני דיגום לא-פולשני, דורשת ערך PI נמוך מ-0.001 (Waits *et al.*, 2001) ולפיכך, ערך גבוה מזה יגרור הערכת חסר. אולם, באוכלוסיות קטנות בהן השונות הגנטית נמוכה צפוי ערך ה-PI להיות גבוה (Mills *et al.*, 2000) וסביר כי הנחות המודל אינן מתקיימות. בהתחשב בכך שאוכלוסיית המחקר קטנה וכי הסבירות לקרבה משפחתית בין פרטים שונים גבוהה נעשה שימוש בנוסחא מתוקנת - PI(sibs). נוסחא זו מביאה בחשבון קיומה של תת מבניות באוכלוסיה ויחסי קרבה בין פרטים, ומכאן שיוצרת אומדן סביר יותר להסתברות למציאת גנוטיפ רב-אתרי זהה בין שני פרטים שנדגמו מן האוכלוסיה (Evet & Weir, 1998 reviewed in Waits *et al.*, 2001). Woods *et al.* (1999) עשו שימוש בערך של $PI_{(sibs)} < 0.05$ (כלומר, אחד ל-20 פרטים צפוי להציג גנוטיפ זהה לזה של פרט אחר) על מנת להעריך את גודל האוכלוסיה של דובים חומים, בהסתמך על גנוטיפים רב-אתריים שהוגברו מ-DNA שהופק מפרווה. טבלה 6 מפרטת את תוצאות מבחני PI ל-4 האתרים ששימשו לזיהוי האינדיוידואלי של פרטים.

טבלה 6- תוצאות מבחן PI, ו-PI(sibs) ל-4 אתרים מיקרוסטליטיים.

Locus	PI/locus	PI_(sibs)/locus	PI (Incremented over loci)	PI_(sibs) (Incremented over loci)
Fca391	0.311	0.559	0.311	0.559
Fca453	0.378	0.598	0.117	0.334
Fca223	0.664	0.817	0.076	0.270
Fca096	0.644	0.909	0.050	0.221

ערכי PI של האתרים השונים נעים בין 0.31 ל-0.66 וערכי PI_(sibs) נעים בין 0.56 ל-0.81. ערך ה-PI המצטבר הוא 0.05 ושל PI_(sibs) הוא 0.22. ערכים אלה גדולים בסדר גודל אחד ויותר מן הדרוש לצורך הבדלה בין פרטים. משמעות הדבר היא כי בהערכת גודל האוכלוסיה התקבלה בהכרח הערכה בחסר. על מנת לקבל ערכי PI קטנים יותר יש להגדיל את מספר האתרים הפולימורפיים באנליזה. עם זאת, יש לקחת בחשבון

שעם הגדלת מספר האתרים באנליזה גדלים הסיכויים להיתקל בשגיאות בגנוטיפ הרב-אתרי (Waits & Leberg, 2000).

האתרים Fca391 ו-Fca453 מציגים את הערכים הנמוכים ביותר של PI מאחר ובהם הוצגה השונות הגבוהה ביותר. בדומה לכך, מבין 4 האתרים ששימשו לאנליזה רק שני אתרים אלו הציגו פולימורפיזם בקרב נמרי המוזיאון. בבדיקת ערכי PI של תוצאות 4 הנמרות מהמוזיאון ל-5 האתרים בהם הוצג פולימורפיזם התקבלו הערכים הבאים: 0.014 עבור PI ו-0.125 עבור $PI_{(sibs)}$, שניהם נמוכים מאלו של אוכלוסיית הבר בשל ווריאביליות גדולה יותר ועל אף שמספר הפרטים קטן. עם זאת יש לזכור כי אין מדובר ב-4 פרטים המייצגים אוכלוסיה אחת ומכאן שהסיכוי לחשוף שונות בין פרטים אלו גדול יחסית. על אף עובדה זו, גם ערכים אלו חוזים כי לא ניתן יהיה להבדיל בין פרטים שונים, בעוד די היה בחלוקה לגנוטיפים ייחודים על מנת להבדיל בין 4 הנמרות.

השימוש הזהיר במעריך קונסרבטיבי לגודל האוכלוסיה עדיף על אחרים שעשויים להעריך את גודלה ביתר, בייחוד כאשר עשויה ההערכה לגרור החלטות הרוות גורל (Eggert *et al.*, 2003). בהתחשב בגודלה הקטן של אוכלוסיית הנמרים, תוספת כוזבת של פרט אחד תשנה את גודל האומדן בכ-10%. בהנחה שלא כל שגיאות ה"תיוג המולקולרי" סולקו, יתכן ונקבעו גנוטיפים כוזבים העשויים לגרום להערכה ביתר של גודל האוכלוסיה. עם זאת, היות והמשוואה אינה לוקחת בחשבון את קיומם של פרטים שונים המציגים גנוטיפ רב-אתרי זהה, בשל זיווגי קרובים, המעריך שניתן עשוי להעריך את גודל האוכלוסיה בחסר.

תוצאות המחקר מצביעות על כך שהאוכלוסיה כוללת גם נקבות. יחס הזוויגים בקרב אוכלוסיית המדגם הינו 1.7 זכרים לכל נקבה. מאחר ואוכלוסיית הנמרים קטנה ובהסתמך על אומדן גודל האוכלוסיה המעיד על כך שסביר כי מרבית הפרטים באוכלוסיה נדגמו, ניתן להשליך מיחס זה על היחס האמיתי באוכלוסיה. כלומר, ניתן להניח שמספר הזכרים עולה על זה של הנקבות. עם זאת יש להתייחס בזהירות ליחס המדויק שכן בהתחשב בגודל האוכלוסיה, תוספת או גריעה של פרט אחד שלא נדגם משנה באופן דרמטי את יחס הזוויגים.

בשנים 1986-7 נטה יחס הזוויגים בקרב נמרי מדבר יהודה לטובת הזכרים והיה 1.3 זכרים לכל נקבה (תמנה, 2000). הצורה בה מחולק שטח המחיה בין נמרים (נחלת זכר אחד חופפת עם נחלתן של 2-3 נקבות), מעידה על כך שיחס הזוויגים אמור להיות הפוך. עדויות מן השנים בהן התנהל מחקרו של אילני מצביעות על הבעייתיות שבהטיה זו ביחס הזוויגים. מאז שנת 1985 ועד תום המחקר, התקיימה בשטח רק נקבה פורייה אחת - שלומציון. בכל פעם שהרתה והמליטה לזכר אחד, בא זכר אחר והרג את הגור/ים על מנת שיוכל הוא להפרותה (אילני, 1991).

מאחר ופרט אחד מהר הנגב הציג בדיוק את אותו גנוטיפ רב-אתרי (1א') כמו 2 הפרטים ממדבר יהודה (ב', ג') קיימת האפשרות כי מתקיים מעבר של פרטים בין שתי תת האוכלוסיות שכן בידוד לאורך זמן צפוי ליצור קיבוע של אללים שונים בכל תת אוכלוסיה (Hedrick, 1995). תוצאה זו אינה מפתיעה לאור תוצאות נמרי המוזיאון בהן שני פרטים מאזורים שונים הציגו זהות ב-7 אתרים, על אף שהפרש השנים ביניהם היה 12 שנה. עם זאת, במידה וקיים בידוד בין תת האוכלוסיות ייתכן כי לא עבר די זמן ויש להתבסס על אנליזה הכוללת מספר רחב יותר של אתרי מיקרוסטליטים. Shkedy & Saltz (2000) מצאו שקיים מסדרון מעבר המגשר בין אוכלוסיית היעלים (*Carpa ibex nubiana*) של מדבר יהודה לזו של הר הנגב שאורכו כ-65 קילומטרים. בהנחה שנמרים, הטורפים העיקריים של יעלים באזור, מסוגלים לחצות מסדרון זה ניתן להניח ששתי תת-האוכלוסיות של הנמרים אינן מבודדות גיאוגרפית זו מזו. למסדרון זה השלכות חשובות בעיקר על נמרי מדבר יהודה שהציגו גנוטיפ רב-אתרי זהה, בעוד נמרי הר הנגב הציגו 5 גנוטיפים נוספים שונים. הימצאן של 2 דגימות DNA של נמרים באזור המסדרון (ראה איור 2) מעיד על כך שנמרים עושים בו שימוש. לפיכך ההגנה על מסדרון זה, בו נדגמו שני פרטים, כמו גם על שאר השטחים המאוכלסים על ידי נמרים חיונית לצורך מניעת הידרדרות גנטית נוספת. בהיבט של שימור מגוון המינים במדבר יכול הנמר לשמש מין מטריה (Berger, 1997). המושג מין מטריה מתייחס למינים בעלי גודל גוף גדול הנעים למרחקים גדולים. על ידי הגנה על שטחי המחיה הנרחבים הדרושים לצורך קיומן של אוכלוסיות של מינים אלו, ישמר די שטח שיתמוך בקיומם של בעלי חיים נוספים המאכלסים את בית הגידול (Wilcox, 1984). הגנה על השטחים המאוכלסים על ידי נמרים תשרת מינים מדבריים נוספים דוגמת הצבוע (*Crocota* והיעל (*Carpa ibex nubiana*) המצויים בסכנה.

5.4 השלכות לעתיד

ניתן להשוות את אוכלוסיית המחקר לאוכלוסיית אי. אוכלוסיות איים מציגות לרוב שונות גנטית נמוכה ונוטות לקיבוע באתרים גרעיניים (Miththapala et al., 1991; Miththapala et al., 1996). לאור מספר הפרטים המועט, השונות הגנטית הנמוכה והבידוד המוחלט מאוכלוסיות אחרות של תת המין, נתונה האוכלוסיה לזיווגי שארים. לשלושת גורמים אלה יחדיו אפקט סינרגיסטי שכן ככל שהאוכלוסיה קטנה כן גדל שיעור זיווגי השארים ומכאן גם מוצאת הירידה בשונות הגנטית. ההשפעות השליליות של זיווגי שארים עשויות להתבטא בעליה ברגישות האוכלוסיה למחלות זיהומיות ובירידה בהצלחה הרבייתית המתבטאת בשיעורי תמותה גבוהים בקרב הצאצאים, ירידה בגודל השגר וחוסר פוריות (O'Brien, 1994; Frankham, 1998). על

מנת מנוע הכחדה כתוצאה מהידרדרות גנטית נוספת, ניתן להעביר פרטים מאוכלוסיות קרובות או מתת מין קרוב (Hedrick, 2001).

מאחר ולא נצפו או נלכדו נמרים במהלך המחקר לא ידוע אם פרטים באוכלוסיה מציגים ליקויים פיסיוולוגיים או רבייתיים בהשפעת זיווגי השארים. עם זאת שני ממצאים עיקריים מרמזים על קיומם של זיווגי שארים: (1) 6 מתוך 11 אתרים מיקרוסטילטיים הציגו דגם מונומורפי (2) שלושה פרטים שונים הציגו דגם גנוטיפי רב-אתרי זהה לחלוטין לכל 11 האתרים שנבחנו. שילובם של פרטים חדשים באוכלוסיה יכול לשקם באופן דרמטי את רמות השונות הגנטית. דוגמא קיצונית לכך היא פנתר פלורידה (*Felis concolor coryi*). זיווגי שארים אינטנסיביים בתת מין זה גרמו לירידה בפוריות (O'Brien, 1994) ויצרו סממנים פנוטיפיים כגון עיוות דמוי קרס בקצה הזנב וקווצת פרווה (cowlick) בגב. בעקבות אינטרודוקציה של פרטים מאוכלוסיה קרובה נעלמו שתי התופעות הפנוטיפיות כמעט לחלוטין כבר ב-2 דורות הצאצאים הראשונים (Land & Lacy, 2000 reviewed in Hedrick, 2001). על מנת ליישם תכנית שיקום מעין זו על אוכלוסיית הנמרים בארץ, יש לערוך מחקר השוואתי ולבחון את התרומה הגנטית הפוטנציאלית של הפרטים החדשים. אינטרודוקציה של פרטים חדשים מתת המין המצוי בארץ עשויה להיות בעייתית. ראשית, תפוצתו של תת המין מוגבלת לחצי-האי ערב ומוערך כי נותרו פחות מ-100 פרטים (Nader, 1996; Hellyer, 1993 reviewed in Cunningham & Gross, 2000). לפיכך הוקמו באיחוד האמירויות ובעומאן גרעיני רבייה של נמרים במטרה לאפשר השבה לטבע בעתיד (Cunningham & Gross, 2000) ולהבטיח את עתידו של תת המין. בעיה נוספת כרוכה ביחסים שבין מדינת ישראל למדינות בהן מתקיימות האוכלוסיות השרידיות של תת המין, העשויים להוות מכשול בכינון של שיתוף פעולה.

5.5 סיכום

מחקר זה מספק את האומדן הראשון לגודל אוכלוסיית הנמרים בישראל, בהסתמך על נתונים גנטיים. על אף שנמרים כלל לא נראו לכל אורך תקופת הדיגום, גלליהם ספקו תשובות לשאלות שלרוב ניתן לענות עליהן רק באמצעות מגע ישיר עם בעל החיים. לשיטת הדיגום הלא-פולשנית יתרונות על פני שיטות שמערבות לכידה וסימון, בייחוד בהתחשב בקושי שבהשגת דגימות דם או רקמה מבעל חיים חמקני כדוגמת הנמר. עם זאת, חשוב להכיר בשגיאות הפוטנציאליות הכרוכות ב"תיוג" מולקולרי בהתבסס על DNA שמקורו בדיגום לא-פולשני ולהימנע מהן.

על מנת לקבל אומדן מדויק יותר לגודל האוכלוסיה בעתיד, יש לשפר את מערך הדיגום באופן שיתיישב טוב יותר עם הנחות המודל האסימפטוטי (Eggert et al., 2003). בנוסף, יש לסרוק אתרים מיקרוסטילטיים

נוספים, בעיקר טרי- וטטרא-נוקלאוטידיים העוקפים את בעיית ה-shadow-bands ואף לסרוק את גנום הנמר לצורך מציאת אתרים מסוג זה ועיצוב פריימרים ספציפיים למין. על ידי הימנעות מסריקת אתרים דינוקלאוטידיים הנוטים לייצר דגם לא קריא בג'ל, יחסכו כסף וזמן יקר - שיוכלו להירתם ליישום שיטת ה-multiple-tubes. בנוסף, כינון שיתוף פעולה עם חוקרי נמרים במדינות ערב עשוי לשפר את הסיכויים להצלחת תת המין *Panthera pardus nimr* מהכחדה.

תוצאות המחקר הנוכחי אינן מספקות את כל המידע הדרוש לצורך בניית תכנית ממשק לאישוש אוכלוסיית הנמרים. עם זאת, ממצאי המחקר מעידים על הימצאם של 3 נקבות ו-5 זכרים לפחות, ומשאירים מקום לתקווה כי האוכלוסיה מסוגלת להתרבות.

6. רשימת ספרות

אייל, י. (1990). מצבה של אוכלוסיית הנמרים בישראל. סיכום נתוני מחקרו של גיורא אילני עבור רשות שמורות הטבע.

אילני, ג. (1991). קץ השושלות. מסע אחר 20, 54-57.

לוי, ש. (1976). נמרי סיני: סיפורה של הכחדה. טבע וארץ 1, 8-14.

מנדלסון, ה. ויום-טוב, י. (1987). האנציקלופדיה של החי והצומח בארץ ישראל. החברה להגנת הטבע ומשרד הביטחון- ההוצאה לאור.

רייכמן, א. ושלמון, ב. (1992). סקר נמרים בנגב. מרכז מידע על יונקים ורשות שמורות הטבע.

רייכמן, א. (1993). סקר נמרים בדרום מדבר יהודה. רשות שמורות הטבע.

רשות הטבע והגנים (2002). על מצבם של מיני הבר בישראל, אומדן של אוכלוסיות נבחרות.

רשות שמורות הטבע (1979). שמירת טבע בישראל, מחקרים וסקרים 3, 125-140.

רשות שמורות הטבע (1999). תצפיות חדשות בנמרים עד מאי 1999.

שלמון, ב. (1997). סקר נמרים בהר הנגב. החברה להגנת הטבע ורשות שמורות הטבע.

תמנה, י. (2000). נמרי מדבר יהודה. החברה להגנת הטבע ורשות הטבע והגנים.

Allen, P. J., Amos, W., Pomeroy, P. P. & Twiss, S. D. (1995). Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British colonies. Mol. Ecol. 4, 653-662.

Bailey, T. N. (1993). The African Leopard: Ecology and Behavior of a Solitary Felid. Columbia University Press, New York.

Bayes, M. K., Smith, K. L., Alberts, S. C., Altmann, J. & Bruford, M. W. (2000). Testing the reliability of microsatellite typing from faecal DNA in the savannah baboon. Cons. Gen. 1, 173-176.

Bender, D. J., Contreras, T. A. & Fahrig, L. (1998). Habitat loss and population decline: A meta-analysis of the patch size effect. Ecology 79(2), 517-533.

Berger, J. (1997). Population Constraints Associated with Black Rhinos as an Umbrella Species for Desert Herbivores. *Conserv. Biol.* 11, 69-78.

Charalsawad, C. & Limprasert, P. (2000). Rapid and simple sex determination by PCR using SRY and ALT1 primers. *Songkla Med. J.* 18(2), 115-119.

Cornuet, J. M. & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequencies. *Genetics* 144, 2001-2014.

Crandall, L. S. (1964). *Management of Wild Mammals in Captivity*. University of Chicago Press, Chicago.

Creel, S., Spong, G., Sands, J. L., Rotella, J., Ziegle, J., Joe, L., Murphy, K. M. & Smith, D. (2003). Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Mol. Ecol.* 12, 2003-2009.

Crooks, D. R. & Soule, M. E. (1999). Mesopredator release and avifaunal extinctions in a fragmented system. *Nature* 400, 563-566.

Crooks, K. R. (2002). Relative sensitivities of mammalian carnivores to habitat fragmentation. *Conserv. Biol.* 16, 488-502.

Culver, M., Menotti-Raymond, M.A. & O'Brien, S.J. (2001). Patterns of size homoplasy at 10 microsatellite loci in Pumas (*Puma concolor*). *Mol. Biol. Evol.* 18(6), 1151-1156.

Cunningham, P. L. & Gross, C. (2000). Reproduction and development of the Arabian Leopard, *Panthera pardus nimr* in captivity. *Zool. Middle East* 20, 9-14.

Eggert, L. S., Eggert, J. A. & Woodruff, D. S. (2003). Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Mol. Ecol.* 12(6), 1389-402.

Ernest, H. B., Penedo, M. T., May, B. P., Syvanen, M. & Boyce, W. M. (2000). Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Mol. Ecol.* 9, 433-441.

Farrel, L. E., Roman, J. & Sunquist, M. E. (2000). Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Mol. Ecol.* 9, 1583-1590.

- Forbes, S. H., Hogg, J. T., Buchanan, F. C., Crawford, A.M. & Allendorf, F. W. (1995). Microsatellite evolution in congeneric mammals: Domestic and bighorn sheep. *Mol. Biol. Evol.* 12, 1106-1113.
- Frankham, R. (1998). Inbreeding and extinction: island populations. *Conserv. Biol.* 12, 665-675.
- Frantzen, M. A., Silk, J. B., Wayne, R. K. & Kohn, M.H. (1998). Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol. Ecol.* 7, 1423-1428.
- Gagneux, P., Boesch, C. & Woodruff, D. S. (1997). Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Mol. Ecol.* 6, 861-868.
- Gittleman, J. L. (1996). *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution*. Volumes 1 & 2. Ithaca & London. Cornell University Press.
- Griffith, B., Scott, J. M., Carpenter, J. W. & Reed, C. (1989). Translocation as a species conservation tool: status and strategy. *Science* 245, 477-480.
- Harrison, D. L. & Bates, P. J. (1991). *The mammals of Arabia*. Harrison Zoological Museum, Kent, UK.
- Hedrick, P. (1995). Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. *Conserv. Biol.* 9, 996-1007.
- Hedrick, P. (2001). Conservation genetics: where are we now? *TREE* 6, 629-636.
- Hoss, M., Kohn, M., Paabo, S., Knauer, F. & Schroder, W. (1992). Excrement analysis by PCR. *Nature* 359, 199.
- Hughes, A. E. (1993). Optimization of microsatellite analysis for genetic mapping. *Genomics* 15, 433-434.
- Ihaka, R. & Gentleman, R. (1996). R: a language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* 5, 299-314.
- Ilani, G. (1990). Leopard *Panthera pardus* in Israel. *Cat News* 12, 4-5.
- Iudica, C. A., Whitten, W. M. & Williams, N. H. (2001). Small bones from dried mammal museum specimens as a reliable source of DNA. *Biotechniques* 30, 733-736.

IUCN, "Red-List" (2003). Available from: <http://www.redlist.org>; Internet (accessed on August 2003).

Janczewski, D. N., Modi, W. S., Stephens, J. C. & O'Brien, S. J. (1995). Molecular evolution of mitochondrial 12S RNA and cytochrome b sequences in the pantherine lineage of Felidae. *Mol. Biol. Evol.* 12, 690-707.

Johnson, W. E. & O'Brien, S. J. (1997). Phylogenetic reconstruction of the felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *J. Mol. Evol.* 44(1), S98-S116.

Johnson, W. E., Culver, M., Iriarte, J.A., Eizirik, E., Seymour, K.L. & O'Brien, S. J. (1998). Tracking the evolution of the elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. *J. Hered.* 89(3), 227-232.

Karanth, K. U. & Sunquist, M. (2000). Behavioural correlates of predation by tiger (*Panthera tigris*), leopard (*Panthera pardus*) and dhole (*Cuon alpinus*) in Nagarahole, India. *J. Zoology* 250, 255-265.

Kohn, M. H. & Wayne, R. K. (1997). Facts from feces revisited. *TREE* 12, 223-227.

Kohn, M. H., York, E. C., Kamradt, D. A., Haught, G., Sauvajoy, R. M. & Wayne, R. K. (1999). Estimating population size by genotyping faeces. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 266, 657-663.

Kruglyak, S., Durrett, R. T., Schug, M. D. & Aquadro, C. F. (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10774-10778.

Lerner, I. M. (1954). *Genetic Homeostasis*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

Lewin, B. (1990). *GENES IV*. Oxford: Oxford University Press.

Lucchini, V., Fabbri, E., Marucco, F., Ricci, S., Boitani, L. & Randi, E. (2002). Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the Western Italian Alps. *Mol. Ecol.*, 11, 857-868.

Martin, R. B. & De Meulenaer, T. (1988). Survey of the Status of the Leopard (*Panthera pardus*) in Sub-Saharan Africa. IUCN, Lausanne, Switzerland.

Mendelssohn, H. (1989). Wild cats in Israel. *Cat News* 10, 4-5

Mendelssohn, H. (1990). Anatolian leopard *Panthera pardus tulliana*. Cat News 12

Menotti-Raymond, M., David, V. A., Lyons, L. A., Schaffer, A. A., Tomlin, J. F., Hutton, M. K., O'Brien, S. J. (1999). A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). Genomics 57, 9-23.

Menotti-Raymond, M. & O'Brien, S. J. (1993). Dating the genetic bottleneck of the African cheetah. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3172-3176.

Merola, M. (1994). A reassessment of homozygosity and the case for inbreeding depression in the cheetah, *Acinonyx jubatus*: Implications for conservation. Conserv. Biol. 8, 961-971.

Mills, L. S., Citta, J. J., Lair, K. P., Schwartz, M. K. & Tallmon, D. A. (2000). Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling: Promise and pitfalls. Ecol. Appl. 10(1), 283-294.

Miththapala, S., Seidensticker, J., Phillips, L. G., Goodrowe, K. L., Fernando, S. U., Forman, L. & O'Brien, S. J. (1991). Genetic variation in Sri Lanka leopards. Zoo Biol. 10, 139-146.

Miththapala, S., Seidensticker, J. & O'Brien, S. J. (1996). Phylogeographic subspecies recognition in leopards (*Panthera pardus*): Molecular genetic variation. Conserv. Biol. 10, 1115-1132.

Mizutani, F. & Jewell, P. A. (1998). Home range and movement of leopards (*Panthera pardus*) on a livestock ranch in Kenya. J. Zool. Lond. 244, 269-286.

Murphy, W. J., Menotti-Raymond, M., Lyons, L. A., Thompson, M. A. & O'Brien, S. J. (1999). Development of Feline whole genome radiation hybrid panel and comparative mapping of human chromosome 12 and 22 loci. Genomics 57, 1-8.

Murphy, M. A., Waits, L. P. & Kendall, K. C. (2000). Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis. Wildl. Soc. Bull. 28(4), 951-957.

Murray, D. L., Kapke, C. A., Evermann, J. F. & Fuller, T. K. (1999). Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. Anim. Cons. 2, 241-254.

Myers, N. (1976). The Leopard *Panthera pardus* in Africa. IUCN Monograph No: 5, IUCN Morges, Switzerland.

- Nader, I. A. (1996). Distribution and status of five species of predators in Saudi Arabia. *J. Wildl. Res.* 1(2), 210-214.
- O'Brien, S. J. (1994). A Role for Molecular Genetics in Biological Conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(13), 5748–5755.
- Paetkau, D. & Strobeck, C. (1994). Microsatellite analysis of genetic variation in black bear population. *Mol. Ecol.* 3, 489-495.
- Patetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* 4, 347-354.
- Palomares, F., Godoy, J. A., Piriz, A., O'Brien, S. J. & Johnson, W. E. (2002). Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Mol. Ecol.* 11, 2171-2182.
- Pocock, R. I. (1932). The leopards of Africa. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 33, 543-591.
- Primm, S. A. & Clark T. W. (1996). Making Sense of the Policy Process for Carnivore Conservation. *Conserv. Biol.* 10, 1036-1045.
- Qumsiyeh, M. B., Amr, Z. S. & Shafei, D. M. (1993). Status and conservation of carnivores in Jordan. *Mammalia*, 57(1), 55-62.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). GENEPOP Version 1.2.: population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248-249.
- Reed, J. Z., Tollit, D. J., Thompson, P. M. & Amos, W. (1997). Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol. Ecol.* 6, 225-234.
- Salvatori, V., Okarma, H., Ionescu, O., Dovhanych, Y., Find'o, S. & Boitani, L. (2002). Hunting legislation in the Carpathian Mountains: implications for the conservation and management of large carnivores. *Wildl. Biol.* 8, 3-10.
- Schwartz, M. K., Tallmon, D. A. & Luikart, G. (1998). Review of DNA-based census and effective population size estimators. *Anim. Conserv.* 1, 293-299.

- Schwartz, M. K., Tallmon, D. A. & Luikart, G. (1999). Using genetics to estimate the size of wild populations: many methods, much potential, uncertain utility. *Anim. Conserv.* 2, 321-323.
- Seddon, P. J. & Soorae, P. S. (1999). Guidelines for subspecific substitutions in wildlife restoration projects. *Conserv. Biol.* 13(1), 177-184.
- Shaffer, M. L. (1981). Minimum population sizes for species conservation. *BioScience* 3, 131-134.
- Shaffer, H. B., Fisher, R. N. & Davidson, C. (1998). The role of history collections in documenting species declines. *TREE* 13(1), 27-30.
- Shkedy, Y. & Saltz, D. (2000). Characterizing core and corridor use by nubian ibex in the negev desert, Israel. *Conserv. Biol.* 14(1), 200-206.
- Shoemaker, A. H. (1990). Leopard Studbook, Riverbanks Zoological Park, Colombia, South Carolina.
- Shoemaker, A. H. 1993. The status of the leopard, *Panthera pardus*, in nature: a country by country analysis. Riverbanks Zoological Park, Columbia, South Carolina.
- Slattery, J. P. & O'Brien, S. J. (1998). Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. *Genetics* 148, 1245-1225.
- Slattery, J. P., Sanner-Wachter, L. & O'Brien, S. J. (2000). Novel gene conversion between X-Y homologues located in the nonrecombining region of the Y chromosome in Felidae (Mammalia). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(10), 5307-5312.
- Spong, G., Hellborg, L. & Creel, S. (2000). Sex ratio of leopards taken in trophy hunting: genetic data from Tanzania. *Conserv. Genet.* 1, 169-171.
- Spong, G., Johansson, M. & Bjorklund, M. (2000). High genetic variation in leopards indicates large and long-term stable effective population size. *Mol. Ecol.* 9, 1773-1782.
- Sunnucks, P., Wilson, A. C., Beheregaray, L. B., Zenger, K., French, J. & Taylor, A. C. (2000). SSCP Is Not So Difficult: The Application and Utility of Single-Stranded Conformation Polymorphism in Evolutionary Biology and Molecular Ecology. *Mol. Ecol.* 9, 1699-1710.

- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P. & Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* 24(16), 3189-3194.
- Taberlet, P., Camarra, J. J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L. P., Dubois-Paganon, C., Burke, T. & Bouvet, J. (1997). Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Mol. Ecol.* 6, 869–876.
- Taberlet, P. & Waits, L. P. (1998). Non-invasive genetic sampling. *TREE* 13, 26–27.
- Taberlet, P., Waits, L. P. & Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: Look before you leap. *TREE* 14(8), 323-327.
- Turnbull-Kemp, P. (1967). *The Leopard*. London and Cape Town. Howard Timmin.
- Uphyrkina, O., Johnson, W. E., Quigley, H., Miquelle, D., Marker, L., Bush, M. & O'Brien, S. J. (2001). Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, *Panthera pardus*. *Mol. Ecol.* 10, 2617-2633.
- Uphyrkina, O., Miquelle, D., Quigley, H., Driscoll, C. & O'Brien, S. J. (2002). Conservation Genetics of the Far Eastern Leopard (*Panthera pardus orientalis*). *J. Hered.* 93(5), 303-311.
- Valiere, N. & Taberlet, P. (2000). Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Mol. Ecol.* 9, 2150-2152.
- Valiere, N. (2002). GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Mol. Ecol. Notes* 2, 377-379.
- Valiere, N., Berthier, P., Mouchiroud, D. & Pontier, D. (2002). GEMINI: software for testing the effect of genotyping errors and multilocus approach for individual identification. *Mol. Ecol.* 2, 83-86.
- Valiere, N. (2003). GIMLET v.1.3.2 Guide. Available from: <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/Gimlet/gimlet%20frame1.html>; Internet (accessed on September 2003).
- Waits, J. L. & Leberg, P. L. (2000). Biases associated with population estimation using molecular tagging. *Anim. Conserv.* 3, 191-199.

Waits, L. P., Luikart, G. & Taberlet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol. Ecol.* 10, 249-256.

Wilcox, B. A. (1984). In situ conservation of genetic resources: determinants of minimum area requirements. Pages 639-647 in McNeely, J. A. & Miller, K. R. *National Parks, conservation, and development: the role of protected areas in sustaining society*. Smithsonian Institution Press, Washington D. C., USA.

Wilcox, B. A. & Murphy, D. D. (1985). Conservation strategy: The effects of fragmentation on extinction. *Amer. Nat.* 125, 879-887.

Woodroffe, R. & Ginsberg, J. R. (1998). Edge effects and extinction of populations inside protected areas. *Science* 280, 2126-2128.

Woods, J. G., Paetkau, D., Lewis, D., McLellan, B. N., Proctor, M. & Strobeck, C. (1999). Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildl. Soc. Bull.* 27, 616-627.

Woodworth, L. M., Montgomery, M. E., Briscoe, D. A. & Frankham, R. (2002). Rapid genetic deterioration in captive populations: Causes and conservation implications. *Conserv. Genet.* 3, 277-288.

Yuhki, N. & O'Brien, S. J. (1997). Nature and origin of polymorphism in feline MHC Class II DRA and DRB genes. *The J. Immunol.* 158, 2822-2833.

נספח א- שיטות וחומרים

1. צביעת כסף

Fix

10% Acetic acid- 40 min

Rinse in ddH₂O- 2 min X 2

1% Nitric acid- 2 min

Rinse in ddH₂O- 2 min X 2

Silver

0.1% AgNO₃ in ddH₂O and 0.1% Formaldehyde 37%- 35 min

Rinse in ddH₂O- 5 sec

Develop (cold)

2.5% Na₂CO₃, 0.1% Formaldehyde 37% and 0.75% Sodium thiosulfate 2%- until clear bands appeared

Stop

10% Acetic acid- 5 min

Rinse in ddH₂O- 3 min X 2

Impregnate

14% Glycerol- 15 min

הגיל נשמר בין שני שקפים ונסרק לצורך שמירת התוצאות והצגתן כתמונה.

2. ליגציה וטרנספורמציה

Ligation

5 µL 2 x Ligation Buffer

1 µL pGEM-T Easy Vector

3 µL PCR product

1 µL DNA Ligase

Final volume: 10 µL

Transformation

(In sterile 1.5 mL microcentrifuge tube)

100 μ L E-coli competent cells

5 μ L Ligation reaction

3. קביעת זכריות באמצעות היברידיזציה (DNA dot-blotting)

תגובת PCR ליצירת גלאי מסומן ב-DIG

תערובת הריאקציה הוכנה באופן הבא :

5 μ L 10 x Reaction buffer (no Mg)

3 mM $MgCl_2$

5 μ L dNTP's-DIG mix (2mM of dATP, dCTP, dGTP, 1.9mM dTTP, 0.1mM DIG-dUTP)

15 pmol each primer

2 U Taq DNA polymerase (Fisher biotec)

5 μ g BSA

2 μ L DNA template (PCR product)

ddH₂O to final volume of 50 μ L

אינקורפורציה של ה-DIG בתוצר ה-PCR נבדקה על ידי הרצתו בגיל אגרוז במקביל לתוצר ה-PCR מריאקציה רגילה, כלומר ללא סימון של DIG והשוואה ביניהם. נוכחות ה-DIG בתוצר המסומן מאטה את נדידתו בגיל בעוד התוצר שלא סומן רץ בהתאם לגודלו.

קיבוע דגימות ה-DNA לממברנה

3 μ L מכל דגימת DNA של נמר במיהול של 1:10 הועברו למבחנות ה-PCR. לאחר דנטורציה של 10 דקות בטמפרטורה של 95 °C והעברת המבחנות לאינקובציה בקרח, הוטען 1 μ L מכל דוגמא על גבי ממברנה בעלת מטען חיובי. לצורך קיבוע ה-DNA הועברה הממברנה למכשיר UV cross-linker והוקרנה במינון של 1200 μ J/CM².

שלבי ההיברידיזציה והחשיפה (detection) נערכו על פי הפרוטוקול הבא :

היברידיזציה

50% Formamide, 0.01% N-lauroylsarcosine, 0.002% SDS, 0.2% Blocking reagent, 5X SSC, 2 h at 40 °C

50% Formamide, 0.01% N-lauroylsarcosine, 0.002% SDS, 0.2% Blocking reagent, 5X SSC, 15-20 ng/mL denaturized Dig-probe, over night at 40 °C

0.1% SDS in 2X SSC, 5 min X2, 40 °C

0.1% SDS in 0.5X SSC, 5 min X2, 40 °C

היברידיזציה ופרה היברידיזציה בוצעו בבקבוקי היברידיזציה בתנור בעל תוף מסתובב.

חשיפה

Washing buffer X1, 1 min (room Temp.)

1% Blocking solution, 1 h

Anti-Digoxigenin-AP solution, 30 min

Washing buffer X1, 15 min x2

Detection buffer X1, 2 min

1% CSPD in detection buffer, 15 min at 37 °C

בשלב האחרון נחשפה הממברנה ל- X-ray film למשך 2-12 שעות.

נספח ב- תוצאות אנליזת אתרים מיקרוסטליטים של כל דגימות ה-DNA מאוכלוסיית הבר.

דגימות המסומנות ב-* הושמטו מהאנליזה לזיהוי אינדיווידואלי בשל נתונים חסרים ב-4 האתרים המודגשים ושיעורי תגובה נמוכים.

Fca441	FCA105	Fca247	Fca224	Fca310	Fca094	Fca077	F37	F115	Fca096	Fca391	Fca453	Fca223	Leo #
158, 158	226, 202	157, 145	118, 118		214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	18
	202, 202	157, 157	118, 118			144, 144	229, 229	206, 212	210, 210		177, 173	177, 177	19*
158, 158	202, 202	157, 157	118, 118		214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	21
	202, 202	157, 145	118, 118		214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	22a
	226, 202	157, 157	118, 118		214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	i
158, 158		157, 157	118, 118			144, 144		206, 212	210, 210	209, 209	177, 173	177, 177	55
								206, 212	210, 210	209, 215	173, 173	177, 177	56
		157, 157	118, 118		214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 202	209, 215	177, 173	177, 177	64
	202, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	70
158, 158	202, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 169	80
158, 158	202, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	148
158, 158	226, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 169	155
158, 158	226, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 169	160
158, 158	202, 202	157, 157		172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	188
	202, 186	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	193
		157, 157				144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	173, 173	177, 177	194
						144, 144	229, 229	206, 212			177, 173	177, 177	197*
158, 158		157, 157	118, 118			144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	198
	202, 202		118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	201
	202, 186	157, 157	118, 118		214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	202
	202, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	212
	202, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	213
158, 158	202, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214		229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	214
158, 158		157, 157	118, 118		214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	215
158, 158		157, 157	118, 118	172, 172			229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 177	177, 177	222

Fca441	FCA105	Fca247	Fca224	Fca310	Fca094	Fca077	F37	F115	Fca096	Fca391	Fca453	Fca223	Leo #
	202, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144	229, 229	206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	223
		157, 157	118, 118	172, 172			229, 229	206, 212	210, 210		177, 173	177, 177	224*
158, 158		157, 157	118, 118	172, 172	214, 214		229, 229	206, 212	210, 206	209, 215	177, 177	177, 177	233
158, 158		165, 165	118, 118		214, 214			206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	234
	202, 186	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144		206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	235
		157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144		206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	236
	202, 186	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214	144, 144		206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	237
			118, 118								173, 173	177, 177	239*
			118, 118					206, 206	210, 210		173, 173	177, 169	240*
		157, 157	118, 118	172, 172	214, 214			206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	241
158, 158	202, 202	157, 157	118, 118	172, 172		144, 144		206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	243
158, 158	202, 202	157, 157	118, 118	172, 172	214, 214			206, 212		209, 215	177, 173	177, 177	245*
158, 158	202, 186			172, 172	214, 214	144, 144		206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	246
	202, 186	157, 157		172, 172	214, 214	144, 144		206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	247
	202, 186	157, 157		172, 172	214, 214			206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	248
158, 158	202, 202			172, 172	214, 214			206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	259
158, 158	226 ,226			172, 172	214, 214			206, 212	210, 210		173, 173	177, 177	260*
158, 158	202, 202							206, 212	210, 210		177, 173	177, 177	261*
	202, 202			172, 172				206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	262
				172, 172				206, 212	210, 210	203, 215	177, 177	177, 169	263
				172, 172				206, 212	210, 210	209, 215	173, 173	177, 177	264
	202, 202							206, 212	210, 210		173, 173	177, 177	265*
158, 158	202, 202			172, 172				206, 212	210, 210	209, 209	173, 173	177, 177	266
	202, 186			172, 172				209, 209		209, 215	173, 173		267*
	202, 202			172, 172				206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	270
				172, 172	214, 214			206, 212		209, 209	177, 173	177, 177	280*
	202, 202		118, 118	172, 172				206, 212	210, 210	209, 215	177, 173	177, 177	282
	226, 202		118, 118	172, 172					210, 210		177, 173	177, 169	283*
	202, 186		118, 118						210, 210		177, 173	177, 169	284*

נספח ג- תוצאות מבחן הזויג באמצעות היברידיזציה (dot-blotting) ו-PCR.

שיטה	היברידיזציה			PCR ללא ספציפיות
	ספציפיות לזויג	ספציפי לזכרים	ללא ספציפיות	
סמן (גודל)	אוליגונוקלאוטיד P.p.Zfy (21 bp)	תוצר PCR של ZF2F/ZFY1R (~720 bp)	תוצר PCR של δ ZfyF/Exon6R (~900 bp)	תוצר PCR של rps4XF/rps4XR (~500bp)
דגימה				
i		+	+	+
18		+	+	
19	+	+	+	
21		+	+	+
22		+	+	
55		+	+	
56		+		
64	+	+	+	+
70		+	+	+
80	+	+		+
148	+	+	+	+
155	+	+	+	+
160	+	+	+	+
188	+	+	+	+
193	+	+	+	+
194				+
197				+
198	+	+	+	+
201	+	+	+	+
202		+	+	+
212	+	+	+	+
213	+	+	+	+
214	+	+	+	+
215	+	+	+	+
222				+
223	+	+	+	+
224				
233		+	+	+
234				
235		+	+	+
236		+	+	
237		+	+	+
239				+
240	+			+
241	+	+	+	+
243	+	+	+	+
245	+	+	+	
246	+	+	+	+
247	+	+	+	
248	+	+	+	+
259				

				260
+	+	+		261
	+	+		262
	+	+	+	263
	+	+	+	264
	+	+	+	265
				266
+	+		+	267
+	+	+		270
+	+	+		280
+	+	+	+	282
+	+	+		283
		+	+	284
לא בוצע	לא בוצע	לא בוצע		Zoo-Fe1
לא בוצע	לא בוצע	לא בוצע		Zoo-Fe2
+	+			ציה

Abstract

The population of leopards in the Judean desert and the Negev highlands is part of a critically endangered subspecies, the Arabian leopard (*Panthera pardus nimr*), which occurs in Oman, the United Arab Emirates, Saudi Arabia, Yemen and Israel. Only about 100 individuals occur in the wild. The expansion of land-use that has accompanied human population growth has caused fragmentation of this subspecies' natural habitat. Because of natural low population densities and their solitary life style, leopards are extremely sensitive to the loss and fragmentation of their natural habitat. The isolation of small subpopulations might cause the loss of potential sources of immigrants, leading to close inbreeding and its concomitant deleterious effects, and might in turn increase the extinction probability of these isolated populations. This highly endangered subspecies is subject to intensive conservation efforts in the United Arab Emirates and Oman which include captive breeding programs.

An eighteen-year study of the Judean desert population was conducted by Giora Ilani until the late 1980's, but the Negev population was never studied and the number of individuals in the wild was never determined. The main purpose of the present study was to estimate the population size both in the Judean desert and the Negev highlands. Knowing the population size of the Arabian leopard in Israel will assist in the formulation of an effective management program to save the subspecies from becoming locally extinct.

Feces were systematically collected along the main gorges frequently used by leopards over two years. Various molecular analyses were implemented at the level of the species, population and individual on DNA extracted from the feces. Such non-invasive sampling allows genetic studies of free-ranging animals without the need to capture or even observe them, and increases the chances of obtaining a large enough sample. Fecal DNA was typed for several microsatellite loci to deduce the number of unique multilocus genotypes in the population. The power of multilocus genotypes for identifying individuals was quantified for individual loci by calculating the probability of identity (PI). This estimator evaluates the probability that two individuals, drawn at random from a population, will have the same genotype at multiple loci.

Assuming that each unique genotype represents a different leopard, the population size was projected as the asymptote of a rarefaction curve, describing the cumulative number of unique multilocus genotypes as a function of the number of feces typed. In addition, the sex of each DNA sample was determined using specific markers of both the sex-chromosomes.

During this study, 54 leopard DNA samples were obtained, in different locations in the study area. Integrating the molecular analysis data with the spatial distribution of the locations where the feces were found, enabled discrimination of eight different individuals: a male and a female in the Judean desert, and two females and four males in the Arava and the Negev highlands.

The microsatellite typing results revealed very low genetic variability and many loci were found monomorphic, implying close inbreeding and genetic drift, which are typical in very small populations. Three individuals had identical multilocus genotypes, such that only geographic and sex data made it possible to discern among them. The population size analysis estimated that there are seven unique genotypes in the wild population.

This study provides the first estimate of the size of the Arabian leopard population in Israel using genetic data. Although leopards were never seen during this study, their feces provided answers to questions that would usually require direct observation and handling of animals. Considering the low genetic variation found, the population might benefit from the introduction of individuals from related populations for genetic restoration. The results also have conservation implications; the presence of five males and three female leopards gives good reason for optimism for an increase in the size of this small population.

**TEL-AVIV UNIVERSITY
GEORGE S. WISE FACULTY OF LIFE SCIENCES
GRADUATE SCHOOL**

**Estimating the Arabian leopard (*Panthera pardus nimr*)
population size in Israel using fecal DNA**

**Thesis submitted towards the M.Sc. degree in ecology and environmental
quality at Tel-Aviv University**

by

Inbar Perez

The research was performed in the Department of Zoology

Under the supervision of

Dr. Eli Geffen

Dr. Ofer Mokady

December 2003