13 (2) 17-26, Summer 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Feasibility of using morphological features to discriminating wildcat (*Felis lybica*) and domestic cats and Challenges facing conservation of the species in Iran

Seyedeh Marzieh Mousavi [1*], Mansour Poursina [2], Hasan Jahani [3], Turaj Raeisi [4]

[1] *Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *Kerman General Department of Environmental Protection, Kerman, Iran*
[3] *Ilam General Department of Environmental Protection, Ilam, Iran*
[4] *Chaharmahal and Bakhtiari General Department of Environmental Protection, Shahrekord, Iran*

Key Words

Phylogeny
Morphological characteristics
Ecology
Conservation
Wildcat

Abstract

Introduction: Wildcat (*Felis lybica/Felis silvestris*) is one of the Felid species with worldwide distribution that is threatened by specific and potential threatening factor in addition to other human caused threats, i.e. crossbreeding with domestic cat and this issue has led to identification of wildcat in the field moreover conservation of the species to be encountered with some challenges.

Materials & Methods: In current study considering necessity to identify subspecies of wildcat in Iran also morphological investigations, we examined sequence variation of 814 bp of mitochondrial DNA NADH5 gene from 38 possible wildcat samples collected across Iran.

Result: Phylogenetic analyses represented wildcat in Iran divides into two subclades that in combination of worldwide sequences of wildcat, Iranian sequences placed between Asiatic wildcat and African wildcat/domestic cat. Using extant pictures of wildcat in this study together with related protocols, feasibility of using morphological features to discriminating wild samples from domestic ones was examined, however considering of poor quality of photos without related details, no definite results were obtained in this regard.

Conclusion: To discriminating wildcat from domestic cat using morphological characteristics it is needed to have high quality pictures which cover various aspects of morphological features based on related protocols. Therefore, providing a protocol that helps us to identify wild samples from domestics or hybrids in the field is necessary. To conservation of wildcat we have to increase our knowledge about ecological requirements of the species, the situation and the rate of hybridization also effective environmental items on this process.

* Corresponding Author's email: mrmussavi@yahoo.com
Received: 21 April 2020; Reviewed: 9 July 2020; Revised: 3 August 2020; Accepted: 7 September 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.135157

مقاله پژوهشی

امکان سنجی استفاده از صفات ریخت‌شناسی در تفکیک گربه‌وحشی (*Felis lybica*) از اهلی و چالش‌های پیش روی حفاظت گونه در ایران

سیده‌مرضیه موسوی[1*]، منصور پورسینا[2]، حسن جهانی[3]، تورج رئیسی[4]

[1] *گروه علوم محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

[2] *اداره کل حفاظت محیط زیست کرمان، کرمان، ایران*

[3] *اداره کل حفاظت محیط زیست ایلام، ایلام، ایران*

[4] *اداره کل حفاظت محیط زیست چهارمحال و بختیاری، شهرکرد، ایران*

کلمات کلیدی

تبارشناسی
صفات ریخت‌شناسی
بوم‌شناسی
حفاظت
گربه‌وحشی

چکیده

مقدمه: گربه‌وحشی (*Felis lybica/Felis silvestris*) یکی از گربه‌سانانی است با پراکنش وسیع جغرافیایی که علاوه بر عوامل تهدید انسانی به‌وسیله عامل تهدیدی بالقوه و متمایز از سایر گربه‌سانان یعنی اختلاط با گربه‌اهلی نیز در خطر است و همین موضوع، شناسایی گربه‌وحشی در طبیعت و حفاظت از آن‌را با چالش مواجه کرده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر با توجه به ضرورت شناسایی زیرگونه‌های موجود گربه‌وحشی در ایران و انجام بررسی‌های ریخت‌شناسی، ۸۱۴ جفت باز از قطعه NADH5 از ژنوم میتوکندری برای ۳۸ نمونه گربه‌وحشی که از سطح زیستگاه‌های این گونه در ایران جمع‌آوری شده بود توالی‌یابی شدند.

نتایج: تحلیل‌های تبارشناسی، گربه‌وحشی را در ایران به دو زیرکلاد تقسیم کرد که توالی‌های ایران در ترکیب با توالی‌های جهانی گربه وحشی، در بین زیرکلاد گربه‌وحشی آسیایی و زیرکلاد گربه‌وحشی آفریقایی/اهلی قرار گرفتند. با استفاده از تصاویر در دسترس از گربه وحشی در این مطالعه و هم‌چنین دستورالعمل‌های موجود، امکان‌سنجی استفاده از صفات ریخت‌شناسی برای تفکیک نمونه‌های وحشی از اهلی بررسی شد که با توجه به عدم وجود تصاویر با کیفیت و نبود جزئیات لازم در تصاویر، نتایج با عدم قطعیت همراه بود.

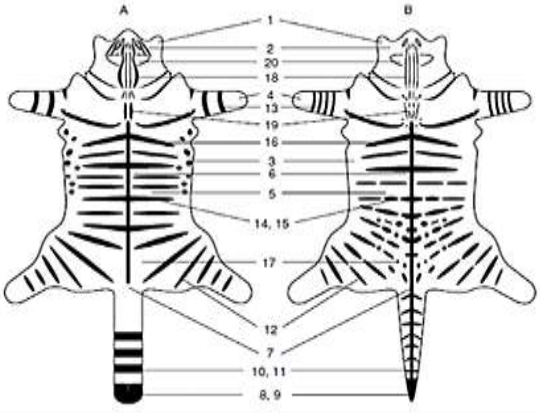
نتیجه‌گیری و بحث: لذا برای شناسایی گربه‌وحشی به‌وسیله صفات ریخت‌شناسی، وجود تصاویر گونه که ابعاد مختلفی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی را براساس دستور العمل‌های مربوطه پوشش دهند الزامی است. ضمن این‌که تهیه دستورالعملی که بتواند در طبیعت با استفاده از ویژگی‌های خز و بدون نیاز به مطالعات مولکولی، امکان شناسایی گربه‌وحشی را فراهم کند، ضروری است. برای حفاظت از گربه وحشی، دانش ما از ویژگی‌های بوم‌شناسی گونه، وضعیت اختلاط، نرخ اختلاط و فاکتورهای محیطی تاثیرگذار بر روی فرایند هیبریداسیون باید افزایش یابد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mrmussavi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۲ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۹ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۳ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۷ شهریور ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.135157

مقدمه

براساس آخرین بازنگری تاکسونومیک گربه‌سانان، تغییراتی در نامگذاری زیرگونه‌های گربه‌وحشی اعمال شده است (Kitchener و همکاران، ۲۰۱۷). گربه‌وحشی اروپایی به دو زیرگونه *F. s. caucasica* *F. s. silvestris* تقسیم شده‌است وگربه‌وحشی آفریقایی نیز به سه زیرگونه (*F. lybica ornata, F. lybica lybica, F. lybica cafra*) تقسیم‌بندی شده است و گربه اهلی در سطح گونه (*Felis catus*) نامگذاری شده است. به‌دلیل گسترش پراکنش گربه‌اهلی و هم‌پوشانی کامل زیستگاهی با گربه‌وحشی، اختلاط این دو تاکسون، تهدیدکننده خلوص ژنتیکی گربه‌وحشی به‌شمار می‌رود (Daniels و همکاران، ۲۰۰۱؛ Pierpaoli و همکاران، ۲۰۰۳؛ Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵؛ Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷؛ O'Brien و همکاران، ۲۰۰۹؛ Say و همکاران، ۲۰۱۲؛ Driscoll و همکاران، ۲۰۱۱؛ موسوی و همکاران، ۱۳۹۹)که می‌تواندانقراض ژنتیکی گربه‌وحشی‌را سبب شود (Duperón و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعات مولکولی نشان می‌دهند گربه‌وحشی آفریقایی (Near Eastern) یا (*Felis lybica lybica*) و گربه اهلی ۱۳۱۰۰۰ هزار سال قبل اجداد مشترک داشتند، هم‌چنین اعداد ۱۰۷ هزار سال قبل و ۱۵۵ هزار سال قبل نیز با سایر روش‌های مولکولی، برای جد مشترک گربه‌وحشی و گربه‌اهلی ذکر شده‌اند (Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷). اگرچه مدارک باستان‌شناسی این عدد را ده هزار سال قبل نشان می‌دهند که در منطقه‌ای به نام هلال حاصلخیز (Fertile Crescent) که زیستگاه امروزی گربه‌وحشی آفریقایی(Near East) (*F. lybica lybica*) بوده و اولین تمدن‌های انسانی در آن‌جا شکل گرفته‌اند، اهلی‌سازی گربه‌وحشی اتفاق افتاده‌است (Daniels و همکاران، ۲۰۰۱؛ Pierpaoli و همکاران، ۲۰۰۳؛ Kitchenerو همکاران، ۲۰۰۵؛ Yamaguchi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷؛ O'Brienو همکاران، ۲۰۰۹؛ Say و همکاران، ۲۰۱۲؛ Ottoni و همکاران، ۲۰۱۷). مطالعه موسوی و همکاران (۱۳۹۷) نشان داد که گربه‌وحشی پراکنش گسترده‌ای در ایران دارد و حتی جنگل‌های واقع در شیب‌های شمالی رشته‌کوه البرز مطلوبیت لازم برای حضور گربه‌وحشی را دارند. مطالعات تبارشناسی گربه‌وحشی با استفاده از ژن سیتوکرم *b* بر روی ۲۲ نمونه گربه‌وحشی (Mousavi و همکاران، ۲۰۱۹) و ژن NADH5 بر روی ۳۸ نمونه گربه‌وحشی در سال ۱۳۹۹ (موسوی و همکاران، ۱۳۹۹)، نشان دادند حضور دو زیرگونه آسیایی (*F. l. ornata*) و آفریقایی (*F. l. lybica*) گربه‌وحشی در ایران دور از انتظار نیست و البته نتایج قطعی‌تر را به استفاده از نشانگرهای هسته‌ای موکول کردند. ضمن این‌که در مطالعات مذکور به‌دلیل عدم استفاده از نشانگرهای هسته‌ای امکان شناسایی نمونه‌های اهلی از وحشی میسر نگردید. Duperón و همکاران (۲۰۱۵) این موضوع را بررسی کردند که ویژگی‌های پوشش خز برای تشخیص فرم‌های وحشی و هیبرید از گربه‌وحشی چقدر دقیق هستند و نتیجه گرفتند سیستم طبقه‌بندی با استفاده از ویژگی‌های خز می‌تواند به‌عنوان یک جانشین برای رویکردهای مولکولی، استفاده شود، اما فقط بعد از یک بررسی دقیق از ویژگی‌هایی که قدرت بیش‌تری در تمایز این دو گروه از هم داشته باشند. مطالعه Ragni و Possenti (۱۹۹۶) نشان می‌دهد که تغییرات ریخت‌شناسی در سیستم رنگ پوشش و علائم روی بدن گربه‌های وحشی و خانگی وجود دارد و این تغییرات مثل مشخصات متریک، می‌تواند برای تمایز بین فنوتیپ‌ها به‌کار رود. Kitchener و همکاران (۲۰۰۵)دستورالعملی‌برای‌شناسایی گربه‌وحشی‌اسکاتلندی‌در طبیعت تهیه کردند تا به ابزاری قابل دسترس‌تر برای حفاظت از این گونه شدیداً در خطر انقراض در اسکاتلند دست یابند. Kitchener و همکاران (۲۰۰۵) تاکیدکردند اگرچه مطالعاتی با هدف تمایز گربه‌های وحشی خالص‌از‌گربه‌های اهلی‌و هیبریدهای احتمالی‌آن‌ها براساس مشخصات ریخت‌شناسی‌متنوع ازجمله طول روده‌ای کوتاه‌تر، شاخص جمجمه‌ای کم‌تر از ۲/۷۵ (یعنی جمجمه بزرگ‌تر)، شاخص خلوص براساس اندازه‌گیری‌شاخص‌های‌ریخت‌سنجی‌ومشخصه‌های پوشش خز صورت گرفته‌است، ولی استفاده از این مشخصات برای تفکیک گربه‌اهلی از وحشی در طبیعت کاربرد کمی دارند. Kitchener و همکاران (۲۰۰۵) بررسی ریخت‌شناسی از ۱۳۵ نمونه گربه‌وحشی در اسکاتلند انجام دادند، هیچ‌کدام از نمونه‌های مورد بررسی دارای جهش‌های رایج شامل رنگ پوشش که در گربه‌های خانگی دیده می‌شود، مثل رنگ زرد، سفید یا الگوی غیرمعمول خز نبودند و غالب آن‌ها الگوی پوشش راه‌راه (گربه‌وحشی اروپایی دارای الگوی خز راه راه است) داشتند یا تنها مولفه کوچکی از نمونه خز گربه‌وحشی را داشتند، جدول ۱ و شکل ۱ شرح مشخصاتی است که در مطالعه Kitchener و همکاران (۲۰۰۵) مورد تحلیل قرار گرفتند.



شکل ۱: مشخصه‌های ریخت‌شناسی تعریف شده برای گربه‌اهلی، گربه هیبرید و گربه‌وحشی در جدول ۱، همه ویژگی‌ها در شکل A (گربه‌وحشی) نمره ۳ و در شکل B (گربه‌اهلی) نمره ۱ دارند به‌جز ویژگی شماره ۱۴ (الگوی راه‌راه) (Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵)

Devillard و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند چگونه نشانه‌های ریخت‌شناسی و آناتومی برای تشخیص گربه‌وحشی اروپایی، گربه‌های اهلی و هیبریدهای آن‌ها قابل اعتماد هستند. در مطالعه Devillard و همکاران (۲۰۱۴) اعتبارسنجی ۸ شاخص ریخت‌شناسی، شامل اندازه بدن و الگوی پوشش و ۴ شاخص آناتومی شامل اندازه‌های جمجمه و روده برای تشخیص ۳۰۲ نمونه طبقه‌بندی شده به‌عنوان گربه‌وحشی، گربه‌اهلی و یا هیبرید در فرانسه که براساس آنالیز بیزین (Structure) و نشانگرهای ریزماهواره به‌دست آمده بود، ارزیابی شدند و در انتها نویسندگان مقاله پیشنهاد دادند که تحقیقات آینده باید به سمت تقویت اندازه‌گیری نرخ اختلاط با استفاده از نشانگرهای مولکولی متمایزکننده بیش‌تر و بهبود اندازه‌گیری‌های جمجمه‌ازطریق استفاده از روش‌های ریخت‌سنجی هندسی نو با استفاده از لندمارک‌ها به‌جای ابعاد جمجمه متمرکز شود. این مطالعات نشان می‌دهند تفکیک گربه‌وحشی از اهلی و یا هیبرید با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی نیاز به دانش گسترده‌ای دارد. اگرچه استفاده از رویکردهای متفاوت ریخت‌شناسی و مولکولی و پایش‌های میدانی با استفاده از دوربین‌های تله‌ای به‌طور هم‌زمان، همواره نتایج قابل اطمینان‌تری را تولید خواهند کرد (O'Brien و همکاران، ۲۰۰۹؛ Veli و همکاران، ۲۰۱۵؛ Senn و همکاران، ۲۰۱۸). گربه‌وحشی در ایران علی‌رغم پراکنش گسترده آن در سطح کشور یکی از گربه‌سانانی است که دانش بسیار محدودی در زمینه بوم‌شناسی و وضعیت اختلاط آن با گربه‌اهلی وجود دارد. هدف از این مطالعه شناسایی زیرگونه‌های موجود گربه‌وحشی در ایران با استفاده از ژن میتوکندریایی NADH5 است که براساس این شناسایی، امکان‌سنجی استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی به‌منظور تفکیک گربه‌وحشی و اهلی با استفاده از تصاویر نمونه‌هایی که اطلاعات مولکولی آن‌ها در دسترس است، بررسی شود. هرچند که دستورالعمل‌های موجود بدین‌منظور برای گربه‌وحشی اروپایی تهیه شده‌اند ولی برخی از این ویژگی‌ها برای سایر زیرگونه‌ها نیز قابل استفاده هستند. ضمن این‌که شناسایی و تفکیک گربه‌وحشی و گربه‌اهلی در طبیعت همواره یکی از سوالات مشاهده‌کنندگان است و در این مقاله سعی شده تا نشان داده شود که شناسایی قطعی گربه وحشی در طبیعت و تفکیک آن از نمونه‌های هیبرید و اهلی، تنها با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی، نیاز به دانش فراوان و شناخت ویژگی‌های ریختی نمونه‌های وحشی، اهلی و هیبرید دارد. هدف دیگر این مطالعه بررسی چالش‌های حفاظتی پیش روی حفاظت گربه‌وحشی است که با توجه به موضوع هیبرید آن با گربه‌اهلی دارای تهدیدات مخصوص به‌خود است که در حفاظت از گونه باید مورد توجه برنامه‌ریزان حفاظتی قرار گیرد.

جدول۱: ویژگی‌های خز و نمره‌های متعلق به آن‌ها: نمره ۱ (ویژگی‌های متعلق به گربه‌اهلی)، نمره ۲ (ویژگی‌های متعلق به گربه هیبرید) و نمره شماره ۳ (ویژگی‌های متعلق به گربه‌وحشی) (Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵)

شماره ویژگی ریخت‌شناسی بر روی شکل ۱	ویژگی ریخت‌شناسی	نمره		
		نمره ۱	نمره ۲	نمره ۳
۱	سفیدی روی چانه	امتداد سفیدی تا پوزه	سفیدی روی چانه	عدم وجود سفیدی در چانه
۲	نوارهای روی گونه	عدم وجود نوارهای تیره	نوارهای نامشخص	سه نوار واضح
۳	خال‌های سیاه در زیر بدن	وجود ندارد	نامشخص	مشخص
۴	سفیدی پنجه	سفیدی گسترده روی پنجه	سفیدی پنجه تنها با دسته موهای کوتاه	عدم وجود سفیدی پنجه
۵	سفیدی پهلو	وجود دارد	-	وجود ندارد
۶	سفیدی روی بدن	وجود دارد	-	وجود ندارد
۷	امتداد خط پشتی	وجود ندارد/ تمامی دم را پوشش می‌دهد	امتداد به سمت دم	خط تا ابتدای دم تمام می‌شود
۸	شکل نوک دم	به شکل مخروطی شکل که در انتها تیز می‌شود	حد وسط	نوک دم، تیز نیست
۹	رنگ نوک دم	نه سیاه و نه تیره	تیره	سیاه
۱۰	وضوح نوارهای انتهایی دم	عدم وجود نوار/پیوستگی با خط پشتی	نامشخص	مشخص
۱۱	هم ترازی نوارهای انتهایی دم	عدم وجود نوار/عدم تراز بودن نوارها	عدم اتصال نوارها	هم‌تراز بودن و منظم بودن نوارهای دایره‌ای روی دم
۱۲	نوارهای روی پای عقب	کم‌تر از ۴یا بیش‌تر از ۷ نوار	-	۴-۷ نوار
۱۳	نوارهای احاطه کننده پای جلو	کم‌تر از ۲یا بیش‌تر از ۳ نوار	-	۲ یا ۳ نوار
۱۴	پوشش راه راه الگوی خز	عدم وجود نوار/ عدم غالبیت نوارها	-	پوشش غالب
۱۵	نوارهای منقطع بر روی پهلو و پشت	بیش از ۵۰ درصد نوارها منقطع هستند/بی‌علامت	۲۵-۵۰ درصد نوارها منقطع هستند	کم‌تر از ۲۵ درصد نوارها منقطع هستند
۱۶	نوارهای پشت بدن	کم‌تر از ۷ یا بیش از ۱۱ نوار پیوسته	-	۷-۱۱ نوار پیوسته
۱۷	خال‌های روی پهلو و قسمت پشت	تعداد زیاد خال/بی‌علامت	وجود تعدادی خال	خال وجود ندارد
۱۸	نوارهای انتهای گردن	خیلی باریک/فاقد نوار	حد وسط	۴ نوار ضخیم
۱۹	نوارهای قسمت شانه	نامشخص/فاقد نوار	حد وسط	۲ نوار ضخیم
۲۰	رنگ پشت گوش	هم‌رنگ سر	رنگ زرد متمایل به قرمز(کم‌رنگ)/ قرمز کم‌رنگ	زرد متمایل به قرمز/قرمز کم‌رنگ

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA: برای انجام این مطالعه ۳۸ نمونه بافت از نمونه‌های مشکوک به گربه‌وحشی به‌روش غیرتهاجمی در بازه زمانی ۱۳۹۶-۱۳۹۴ از مناطق حوزه پراکنش این گونه در داخل مناطق تحت مدیریت سازمان حفاظت محیط زیست یا حاشیه مناطق تحت مدیریت، جمع‌آوری شد. نمونه‌های بافت از لاشه‌های مشاهده شده از گربه‌وحشی که به‌دلایل متفاوت ازجمله تصادف جاده‌ای از بین رفته بودند، به‌دست آمدند (شکل ۲). در مواردی گربه‌هایی که در روستاهای حاشیه مناطق به مرغداری‌ها حمله کرده بودند و یا دچار صدمه شده بودند و در تله گیر افتاده بودند، از لاله گوش آن‌ها به‌مقدار ناچیزی نمونه بافت برداشته شد و بعد از نمونه‌برداری، نمونه‌ها رهاسازی شدند (شکل ۳) و البته به‌دلیل تعارض برخی نمونه‌ها توسط مردم بومی کشته شده‌بودند (شکل ۴). حتی الامکان تصاویر نمونه‌ها، موقعیت جغرافیایی مشاهده نمونه و دوری و نزدیکی به مراکز مسکونی و سایر اطلاعات مرتبط جمع‌آوری شدند. برخی از لاشه‌ها بر اثر تصادف کاملاً از بین رفته بودند و از الگوی پوشش، تصویر واضحی وجود نداشت و تنها امکان تهیه بافت برای مطالعات مولکولی از آن‌ها مهیا بود. برخی نمونه‌های بافت از بانک ژن سازمان محیط زیست دریافت شد و لذا تصاویر نمونه در دسترس نبود. یک نمونه گربه‌اهلی از خراسان جنوبی که تصویر آن، اهلی بودن نمونه را براساس فرم غیرمعمول خز نشان می‌داد در بین نمونه‌ها شناسایی شد (شکل ۵). نمونه‌های بافت تا زمان استخراج DNA، در اتانول ۹۶درصد نگه‌داری شدند. برای استخراج DNA از نمونه‌های بافت، از کیت DynaBio متعلق به شرکت تکاپوزیست و دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. ترکیب مواد به‌کار رفته در واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس‌های با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2 ساخت شرکت امپلیکن دانمارک، ۰/۳۷۵ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت پنج پیکو مول، ۲/۵ میکرولیتر DNA با غلظت (۲۰- ۱۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۹/۲۵ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. در هنگام آماده‌سازی نمونه‌ها برای واکنش PCR یک میکروتیوب به‌عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شد. ۸۱۴ جفت باز از قطعه ژن ND5 با استفاده از یک جفت آغازگر زیر تکثیر شد (Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷):

F2B:5’- TGCCGCCCTACAAGCAAT-3’
R3B: 5’-TAAGAGACGTTTAATGGAGTTGAT-3’

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر قطعه ژن ND5 در ۳۵ چرخه، با واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد در سه دقیقه، واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد در یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، گسترش زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد (Tamada و همکاران، ۲۰۰۵). برای بررسی کیفیت محصول به‌دست آمده و تأیید تکثیر قطعه مورد نظر از ژل آگارز یک درصد و با رنگ‌آمیزی Gel Red™ (ساخت شرکت Biotium) در الکتروفورز افقی، با ولتاژ ۸۰ و به‌مدت ۵۰ دقیقه استفاده شد. در نهایت تصاویر مربوط به ژل‌ها با استفاده از دستگاه مستندساز ژل و با استفاده از نور UV ثبت شد. پس از آن محصول PCR تا زمان ارسال برای توالی‌یابی در دمای ۲۰- درجه نگه‌داری شدند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR به‌همراه مقدار مورد نیاز هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت پنج پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی (سئول) ارسال شدند. مراحل تخلیص توسط خود شرکت انجام شد و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه XLABI 3730 به‌روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند. از ابزار BLAST در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده گردید. توالی‌های دریافت شده توسط نرم‌افزار (Applied Seq Scape 2.6 Biosystems) بررسی و خطاهای موجود اصلاح گردید وویرایش نوکلئوتیدی توالی‌ها به‌وسیله این نرم‌افزار انجام شد. ردیف‌یابی توالی‌ها با استفاده از ClustalW در نرم‌افزار MEGA 6 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۳) انجام شد.

رسم درخت‌های تبارشناسی: در مطالعه حاضر دو درخت تبارشناسی با استفاده از ۸۱۴ جفت باز از ژنوم میتوکندریایی ND5 به‌منظور تعیین جایگاه تبارشناسی گربه‌وحشی ایران در بین سایر گربه‌های وحشی جهان ترسیم گردید تا وضعیت زیرگونه یا زیر گونه‌های گربه‌وحشی در ایران مشخص شود. درخت اول تنها با استفاده از ۳۸ توالی از نمونه‌های ایران ترسیم شد. برای رسم درخت اول، تحلیل‌های بیزین با استفاده از نرم‌افزار MrBayes 3.2.2 (Ronquist و Huelsenbeck، ۲۰۰۳) و براساس چرخه زنجیره مارکوف (MCMC) و تعداد ۱۰ میلیون تکرار برای رسم درخت اول اجرا شد. تحلیل‌های احتمال بیشینه با استفاده از RAxML8.2 (Stamatakis، ۲۰۱۴)، با مدل GTRGAMMA و ۱۰۰۰۰ تکرار انجام شد از نمونه‌های گربه جنگلی و گربه شنی به‌عنوان برون‌گروه در رسم درخت استفاده شد. بهترین مدل تکاملی برای ۳۸ توالی ایران، با معیار بیزین (BIC) توسط نرم‌افزار Jmodel test (Posada، ۲۰۰۸)، مدل HKY به‌دست آمد که در رسم درخت بیزین از آن استفاده شد. درخت تبارشناسی دوم با استفاده از ۳۸ توالی مشکوک به گربه‌وحشی از ایران و ۳۲ توالی جهانی گربه‌وحشی که از بانک ژن استخراج شدند شامل گربه‌وحشی اروپایی (*Felis silvestris*) گربه‌وحشی آسیایی (*F. l. ornata*)، گربه وحشی آفریقایی (*F. l. lybica*)، گربه‌وحشی جنوب آفریقا (*F. l. cafra*) و گربه‌اهلی (*F. catus*) (جدول ۲)، ترسیم شد. تحلیل‌های بیزین با استفاده از نرم‌افزار MrBayes 3.2.2 (Ronquist و Huelsenbeck،

۲۰۰۳) براساس چرخه زنجیره مارکوف (MCMC) با چهار اجرای هم‌زمان و تعداد ۲۰ میلیون تکرار اجرا شد. از نمونه‌های گربه جنگلی به‌عنوان برون‌گروه استفاده شدند. بهترین مدل تکاملی برای دسته داده‌های موجود شامل توالی‌های ایران و ۳۲ توالی جهانی گربه‌وحشی، با معیار بیزین(BIC) از نرم‌افزارJmodel test (Posada، ۲۰۰۸)، مدل HKY+I به‌دست آمد که در رسم درخت بیزین از آن استفاده شد.

بررسی‌های ریخت‌شناسی: در این مطالعه تنها تصویر خز ۱۵ نمونه که اطلاعات ناقصی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی را فراهم می‌کرد در اختیار قرار گرفت که تصاویر به‌طور کامل حاوی کلیه اطلاعات شناسایی کننده گربه‌وحشی از اهلی یا هیبرید براساس مطالعه Kitchener و همکاران (۲۰۰۵) نبودند و از تمامی ابعاد خز براساس جدول ۱ و شکل ۱ مشخصه‌های ریخت‌سنجی موجود نبود. اگرچه دستورالعمل موجود (جدول ۱ و شکل۱) برای گربه‌وحشی اروپایی تهیه شده‌است ولی برخی صفات ریخت‌شناسی را می‌توان برای سایر زیرگونه‌ها به‌کار برد. البته قابل ذکر است براساس جدول ۱، شاخص‌ها نمره‌دهی می‌شوند و بعد از آنالیزهای آماری تفکیک انجام خواهد شد که متاسفانه فاقد چنین دستورالعملی برای گربه‌وحشی آسیایی هستیم و تنها براساس برخی ویژگی‌های ظاهری قادر به تفکیک نمونه‌ها بودیم. در این مطالعه در تفکیک نمونه‌ها با توجه به کیفیت تصاویر، تنها امکان استفاده از مشخصاتی هم‌چون فرم نامتعارف خز، وجود لکه‌های سفید در پوشش خز، پوشش زردرنگ خز، بعد فاصله از مراکز مسکونی، فرم صورت و اندازه جمجمه، جثه نمونه و فرم دم، مواردی بودند که حتی‌الامکان از آن‌ها برای تفکیک استفاده شد. برخی از شاخص‌ها هم که احتمال اندازه‌گیری آن‌ها در تصاویر وجود داشت، مخصوص گربه‌وحشی اروپایی بودند که در تصاویر موجود مشاهده نشدند.

جدول ۲: توالی‌های استخراج شده از بانک ژن برای آنالیزهای تبارشناسی ژنND5

ردیف	نام علمی گونه	شماره دسترسی در ژن بانک	ردیف	نام علمی گونه	شماره دسترسی در ژن بانک
۱	EF587016	*F. l.caffra*	۱۷	EF587174	*F. silvestris*
۲	EF587018	*F. l .caffra*	۱۸	MG813961	*F. l. lybica*
۳	EF587025	*F. l. caffra*	۱۹	MG813966	*F. l. lybica*
۴	EF587026	*F. l. ornata*	۲۰	MG813960	*F. l. lybica*
۵	EF587028	*F. l. ornata*	۲۱	MG813953	*F. l. lybica*
۶	EF587029	*F. l. ornata*	۲۲	MG813967	*F. l. lybica*
۷	EF587030	*F. l. ornata*	۲۳	KP202275	*F. l. lybica*
۸	EF587031	*F. l. ornata*	۲۴	EF587099	*F. catus*
۹	EF587032	*F. l. ornata*	۲۵	EF587111	*F. catus*
۱۰	EF587155	*F. silvestris*	۲۶	EF587040	*F. catus*
۱۱	EF587167	*F. silvestris*	۲۷	EF587126	*F. catus*
۱۲	EF587169	*F. silvestris*	۲۸	EF587042	*F. catus*
۱۳	EF587170	*F. silvestris*	۲۹	EF587121	*F. catus*
۱۴	EF587171	*F.silvestris*	۳۰	EF587119	*F. catus*
۱۵	EF587172	*F. silvestris*	۳۱	EF587087	*F. catus*
۱۶	EF587173	*F. silvestris*	۳۲	EF587123	*F. catus*

شکل ۲: نمونه گربه‌وحشی از آذربایجان‌غربی، سمت راست (عکس از احسان مغانکی)، نمونه گربه‌وحشی از زنجان (منطقه انگوران)، سمت چپ (عکس از احسان مغانکی)

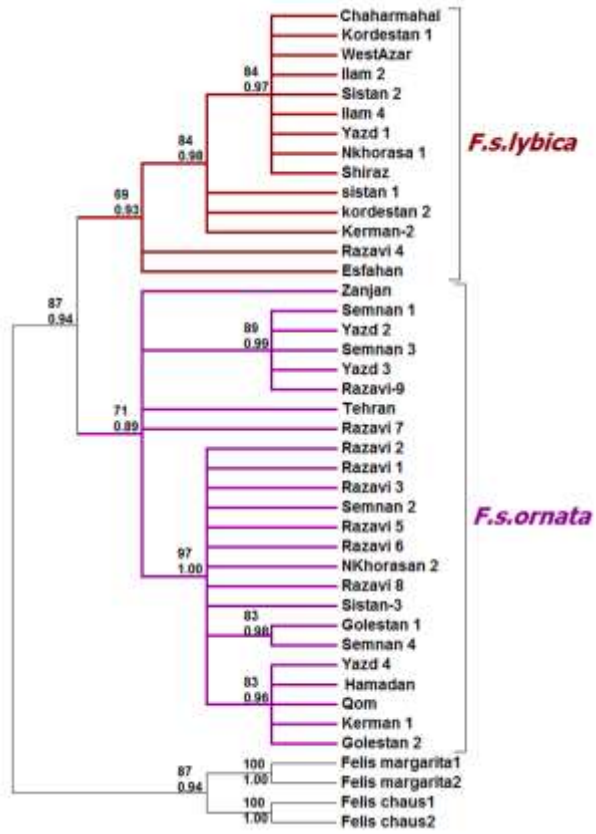
شکل ۳: نمونه گربه‌وحشی از ایلام، سمت راست (عکس از فریدون باویر)، نمونه گربه‌وحشی از سمنان(دامغان)، سمت چپ (عکس از علیرضا شهرداری)

شکل ۴: نمونه گربه‌وحشی از کردستان (عکس از حیدر ویسی)

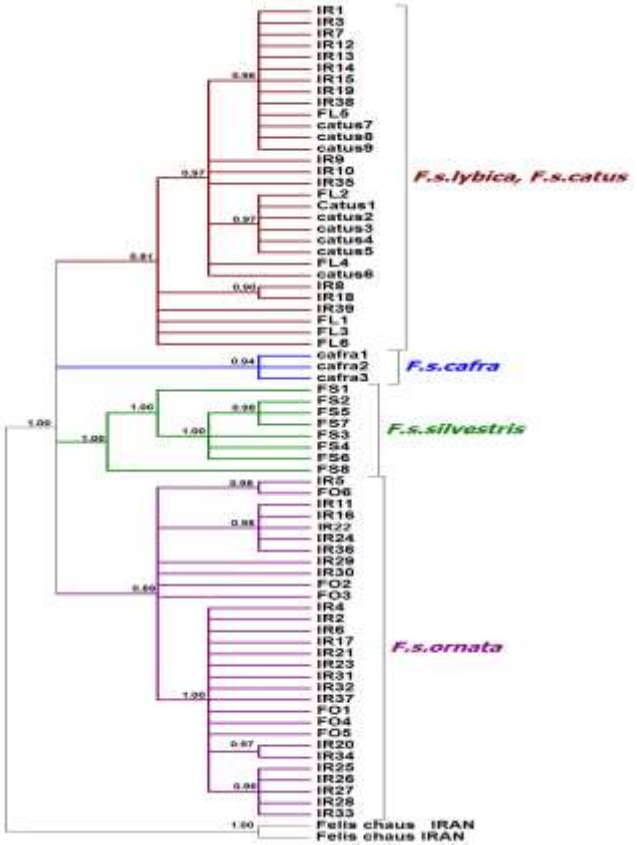
شکل ۵: نمونه گربه‌اهلی از خراسان جنوبی (عکس از محمدرضا بسملی)

نتایج

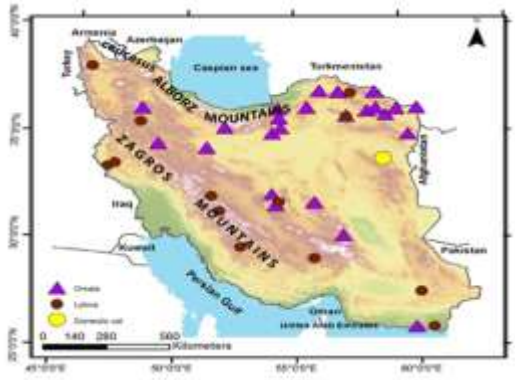
درخت تبارشناسی اول که تنها با استفاده از توالی‌های ایران ترسیم شد نشان می‌دهد توالی‌های گربه‌وحشی در ایران به دو زیرکلاد تقسیم می‌شوند (شکل ۶). در درخت تبارشناسی دوم که توالی‌هایی از سایر گربه‌های وحشی جهان به توالی‌های ایران اضافه شده‌است موید این مطلب‌است که گربه‌وحشی ایران در بین دو زیرکلاد گربه‌وحشی آسیایی (*F. l. ornata*)، و زیرکلاد گربه‌وحشی آفریقایی (*F. l. lybica*)/گربه‌اهلی (*Felis catus*) قرار می‌گیرند (شکل ۷). در زیرکلاد گربه‌وحشی آفریقایی نمونه‌های گربه‌اهلی نیز قرار دارند که به‌دلیل مونوفیلتیک بودن گربه وحشی آفریقایی(*F. l. lybica*)، و گربه‌اهلی(*F. catus*)، توالی‌های این دو تاکسون از یکدیگر جدا نشدند. نقشه پراکنش جغرافیایی نمونه‌ها با استفاده از نتایج درخت تبارشناسی، در نرم‌افزار ArcGIS 10.3 تهیه شد. نمونه‌ها براساس تفکیک صورت گرفته به دو زیرکلاد آسیایی (رنگ بنفش) و زیرکلاد آفریقایی/اهلی (رنگ قهوه‌ای) در نقشه مشخص شدند (شکل ۸).



شکل۶: روابط تبارشناختی گربه‌های وحشی ایران بر اساس ۸۱۴ جفت باز قطعه ND5، گربه شنی(*Felis margarita*) و گربه جنگلی(*Felis chaus*) به‌عنوان برون‌گروه استفاده شدند. اعداد روی شاخه‌ها مقدار بوت استرپ (بالا) و احتمال پسین (زیر) را به‌ترتیب بر اساس احتمال بیشینه و استنتاج بیزین نشان می‌دهند.



شکل ۷: روابط تبارشناختی بین گربه‌های وحشی ایران و گربه‌های وحشی جهان براساس ۸۱۴ جفت باز از ژن ND5، دو توالی گربه جنگلی (*Felis chaus*) از ایران نیز به‌عنوان برون‌گروه استفاده شدند. اعداد روی شاخه‌ها مقدار بوت استرپ (بالا) و احتمال پسین (زیر) را به‌ترتیب براساس احتمال بیشینه و استنتاج بیزین نشان می‌دهند.



شکل ۸: موقعیت جغرافیایی نمونه‌ها و زیرکلاد متعلق به آن‌ها. دایره‌های قهوه‌ای رنگ نمونه هایی که در زیرکلاد آفریقایی/اهلی قرار گرفتند و مثلث بنفش رنگ نمونه‌هایی هستند که در زیرکلاد آسیایی قرار گرفتند. دایره زردرنگ موقعیت نمونه گربه‌اهلی از خراسان جنوبی را نشان می‌دهد.

شکل ۹: نمونه مشکوک به گربه‌اهلی در منطقه هم‌پوشانی دو زیرکلاد گربه‌وحشی از استان خراسان شمالی(عکس از محمدصادق فرهادی‌نیا)

شکل ۱۰: نمونه گربه‌وحشی از استان سمنان، سمت راست (عکس از محمدعلی ادیبی)، نمونه گربه‌وحشی از استان خراسان رضوی، عکس وسط (عکس از محمدعلی ادیبی)، نمونه گربه‌وحشی از خراسان شمالی، سمت چپ (عکس از احمد بحری)

نتایج بررسی‌های ریخت‌سنجی: در مطالعه حاضر از ۳۹ نمونه (۳۸ نمونه مشکوک به گربه‌وحشی و یک نمونه گربه‌اهلی) تنها تصویر خز ۱۵ نمونه که اطلاعات ناقصی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی داشتند در دسترس بود. بررسی‌های ریخت‌شناسی برای تفکیک نمونه‌های وحشی از اهلی نشان داد که برای دستیابی به هدف مذکور، دانش ما از صفات ریخت‌شناسی نمونه‌های وحشی، اهلی و هیبرید باید بالا باشد تا بتوان به‌صورت قطعی تفکیک این تاکسون‌ها را انجام داد و در این زمینه دچار کمبود شدید داده هستیم. به‌کمک نتایج درخت تبارشناسی از این تعداد نمونه که تصویر آنها در دسترس بود یعنی ۱۵ تصویر موجود، ۶ نمونه به زیرکلاد آفریقایی/اهلی و ۹ نمونه به زیرکلاد آسیایی تعلق گرفتند. قابل ذکر است در مطالعه حاضر از کلیه مناطق حوزه پراکنش گربه‌وحشی آفریقایی به‌طور مثال در جنوب‌غرب ایران نمونه‌ای نداشتیم که فرم خز آن‌ها مورد مقایسه دقیق‌تری قرار گیرد. ضمن این‌که تنها تصویر ۶ نمونه از نمونه‌های زیرکلاد آفریقایی/اهلی در اختیار بود و لذا نمی‌توان درخصوص فرم خز گربه‌وحشی با توجه به این اطلاعات ناقص نتیجه‌گیری کرد. ولی به‌نظر می‌رسد فرم غالب گربه‌وحشی در ایران با توجه به تصاویر موجود در این مطالعه فرم خالدار گربه‌وحشی است که با فرم پوششی گربه‌وحشی اروپایی (فرم راه‌راه) کاملاً متفاوت است. با این‌حال با توجه به داده‌های موجود تفکیک صورت گرفته با عدم قطعیت همراه است. تنها یک نمونه (شکل ۵) به‌صورت قطعی با توجه به فرم خاص پوشش، گربه‌اهلی یا هیبرید شناسایی شد. در مناطقی که دو زیرکلاد (آفریقایی و آسیایی) با یکدیگر هم‌پوشانی دارند نیز به‌نظر می‌رسد وجود نمونه‌های اهلی یا هیبرید دور از انتظار نباشد. فلذا نمونه شماره ۹ با توجه به موقعیت جغرافیایی و فرم دم به نظر می‌رسد گربه‌اهلی باشد.نمونه‌های شکل ۱۰ با توجه به شاخص‌های ذکر شده ازجمله فرم دم، جثه بدنی و بزرگی جمجمه، گربه‌وحشی شناسایی شدند که هر سه نمونه در زیرکلاد آسیایی قرار گرفتند. در بین تصاویر، نمونه‌ای از

استان یزد (شهرستان تفت) داشتیم که با توجه به خصوصیات ظاهری، گربه‌وحشی شناسایی شد که در زیرکلاد آسیایی قرار گرفت. ضمن این‌که با توجه به مشخصات ذکر شده نمونه‌هایی که تصاویر آن‌ها در شکل‌های ۲،۳ و ۴ آمده‌اند در توضیح تصویر، تفکیک مربوطه آمده‌است. در بین سایر تصاویری که در اختیار داشتیم یک نمونه از استان چهارمحال و بختیاری باتوجه به شاخص‌های ذکر شده مانند فرم دم، اندازه جمجمه و جثه، گربه‌اهلی شناسایی شد که این نمونه در زیرکلاد آفریقایی/اهلی قرار گرفت و دو نمونه از استان کرمان که تصاویر آن‌ها واضح نبودند و امکان شناسایی مهیا نشد. ذکر این نکته الزامی است که نتیجه‌گیری قطعی درخصوص شناسایی گربه وحشی و اهلی برای نمونه‌های موجود، منوط به استفاده از نشانگرهای هسته‌ای است که نتایج قابل اطمینانی در این‌خصوص تولید خواهد کرد.

بحث

جدا شدن گربه‌اهلی از گربه‌وحشی و در نتیجه امکان اختلاط گربه‌اهلی با گربه‌وحشی، چالش‌هایی را برای حفاظت گربه‌وحشی در پی داشته‌است و اجرای برنامه‌های حفاظتی را برای این گونه با دشواری‌های زیادی همراه کرده است (Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kitchener و همکاران، ۲۰۰۵؛ Kilshaw و همکاران، ۲۰۱۴). تمیز دادن گربه‌وحشی از گربه‌اهلی و یا نمونه‌های هیبرید همواره مورد سؤال زیست‌شناسان و برنامه‌ریزان حفاظت به‌ویژه در کشورهای اروپایی بوده‌است. استفاده از تکنیک‌هایی که بتوانند با سرعت بیش‌تری، شناسایی گربه‌وحشی را از اهلی یا هیبرید آن‌ها در طبیعت انجام دهند همواره مورد نیاز برنامه‌های حفاظتی هستند. در مطالعه حاضر ابتدا با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های تبارشناسی، جایگاه تبارشناسی گربه‌وحشی در ایران به‌دست آمد. ولی در مطالعه حاضر، درخصوص تفکیک نمونه‌های وحشی از اهلی باتوجه به شاخص‌های ریخت‌سنجی، به‌دلیل عدم وجود دستورالعمل مرتبط با شناسایی گربه‌وحشی آسیایی (فرم غالب پوشش در ایران) و کیفیت پایین تصاویر در دسترس نتایج قطعی حاصل نگردید و شناسایی گربه‌وحشی و اهلی با احتمال همراه بود. ضمن این‌که تصویر تمامی نمونه‌ها در دسترس نبود و از برخی نمونه‌ها تنها به نمونه بافت دسترسی داشتیم. لذا با بررسی جوانب موضوع، در این مطالعه تنها امکان استفاده از برخی ویژگی‌ها مانند بعد فاصله از مراکز مسکونی، فرم نامتعارف خز، ، فرم صورت و اندازه جمجمه، جثه نمونه و فرم دم، وجود لکه‌های سفیدرنگ بر روی بدن، پوشش زرد رنگ خز، که با استفاده از این ویژگی‌ها تعدادی از نمونه‌ها به‌صورت غیرقطعی شناسایی شدند. تفکیک صرفاً براساس ویژگی‌های ریختی و نه مطالعات مولکولی نیاز به بررسی‌های جامع از وبژگی‌های خز دارد تا بتواند تفکیک قابل اطمینانی مهیا کند. در این خصوص شناخت ما از شاخص‌های ریختی نمونه‌های وحشی، اهلی و هیبرید باید بالا باشد تا به تفکیک قطعی منجر شود. Duperón و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود تاکید می‌کنند بررسی نرخ هیبریداسیون در جمعیت‌های وحشی از نظر حفاظتی بسیار حیاتی است، از طرفی یافتن نمونه‌های هیبرید در طبیعت بسیار چالش برانگیز است و بنابراین کنترل جمعیت‌های هیبرید در طبیعت به‌عنوان یک ابزار مدیریتی برای حفاظت از هویت ژنتیکی اشکال وحشی، اگر بر پایه رویکردهای ناشیانه یا سیستم‌های طبقه‌بندی ناکامل باشد، بسیار پیچیده‌است و نتایج رضایت‌بخشی در پی نخواهد داشت. با توجه به کاربرد وسیع دستورالعمل‌های موجود در شناسایی گربه‌وحشی در طبیعت، لزوم تدوین چنین دستورالعمل‌هایی برای سایر زیرگونه‌های گربه‌وحشی ازجمله گربه‌وحشی آسیایی به‌شدت توصیه می‌شود. این دستورالعمل‌ها با درنظر گرفتن کلیه ویژگی‌های ریخت‌شناسی در کنار استفاده از نشانگرهای مولکولی ازجمله ریزماهواره‌ها و نمونه‌برداری گسترده در کلیه مناطق پراکنش گربه‌وحشی و مقایسه آن‌ها قابل تدوین هستند. ضمن این‌که انجام مطالعات سیستماتیک جمعیت‌های خالص گربه‌وحشی در مناطق حفاظت‌شده بزرگ و به‌دور از سکونتگاه‌های انسانی برای کسب دانش درخصوص ویژگی‌های بوم شناسی این گونه الزامی است. براساس مطالعه Zwijacz-Kozica و همکاران (۲۰۱۷) در لهستان که با استفاده از ۱۳ نمونه‌ای که به‌روش غیرتهاجمی در بخش‌هایی از پارک ملی Tatra که دارای مطلوبیت بالا برای گربه‌وحشی بود با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی و هسته‌ای مشخص شد تمامی نمونه‌ها گربه‌اهلی هستند و هیچ‌کدام از نمونه‌ها گربه‌وحشی و یا حتی هیبرید نبودند، این مطالعه نشان داد گربه‌اهلی تا عمق پارک ملی Tatra نفوذ کرده و تهدید آن برای گربه‌وحشی بیش از سطحی است که نویسندگان مقاله تصور می‌کردند. هیچ تضمینی نیست که پای گربه‌اهلی حتی به قلب مناطق حفاظت شده در ایران هم باز نشده باشد که نتیجه‌گیری نهایی نیاز به بررسی‌های میدانی و مولکولی برای اثبات این موضوع دارد. به‌طور مثال Sunquist و Sunquist(۲۰۰۲) مسافت روزانه طی شده توسط گربه‌وحشی اروپایی نر و ماده به‌ترتیب ۸/۲ و ۵/۲ کیلومتر در روز بیان کردند. هم‌چنین Monterroso و همکاران (۲۰۰۹) متوسط اندازه گستره‌خانگی برای گربه‌وحشی ماده با استفاده از داده‌های ۶ فرد گربه‌وحشی اروپایی رادیو تله‌متری شده، ۲/۲۸ کیلومتر مربع و برای تنها نر موجود، ۱۳/۷۱ کیلومترمربع به‌دست آوردند. ولی داده‌ها برای گربه‌وحشی آسیایی با توجه به موقعیت جغرافیایی پراکنش به‌طور قطع متفاوت خواهد بود و لذا نتیجه‌گیری نهایی و کسب اطلاعات درخصوص پیمایش‌های روزانه گربه‌وحشی آسیایی در مناطق حفاظت شده منوط به پایش‌های میدانی سیستماتیک در این خصوص است. در مناطق

حفاظت شده بزرگ و به دور از سکونتگاه‌های انسانی، حتی الامکان باید شرایط زیستی ازجمله امنیت، تغذیه و جفت‌یابی برای گربه‌وحشی مهیا باشد تا گربه‌وحشی نیازی به جابه‌جایی نداشته باشد و خطر اختلاط با گربه‌اهلی نیز متوجه گونه نباشد. اگرچه مطالعات بسیاری نشان دادند پارک‌های ملی و مناطق حفاظت شده هنوز می‌توانند نقش مهمی در نگه‌داری خلوص ژنتیکی گربه‌وحشی از طریق کاهش احتمال تماس با گربه‌های اهلی ایفا کنند اما این مناطق شامل مناطق حفاظت شده بزرگ و به دور از سکونتگاه‌های انسانی هستند که نتیجه موثرتری در جلوگیری از هیبرید شدن گربه‌وحشی دارند (Roux و همکاران، ۲۰۱۵). Roux و همکاران (۲۰۱۵) هم‌چنین بیان کردند رویکردهایی مانند ایجاد کریدور بین مناطق حفاظت‌شده برای برقراری جریان‌ژنی بین جمعیت‌های محلی ساکن در مناطق مختلف،بعید است برای حفاظت گربه‌وحشی مؤثر واقع شوند به این دلیل که احتمال اختلاط با گربه‌اهلی در این کریدورها دور از انتظار نیست. اما از سویی لزوم جریان ژن بین جمعیت‌های مختلف و ارتباطات اکولوژیکی جهت افزایش تنوع ژنتیکی گونه‌ها ضرورت دارد که درخصوص گربه‌وحشی به‌دلیل خطر اختلاط با گربه‌اهلی، حاشیه این دالان‌ها که احتمال هیبریدشدن،وجود دارد‌باید به‌دقت تحت حفاظت قرار گیرد (Mattucci و همکاران، ۲۰۱۵). کلیه این رویکردها در حفاظت از گربه‌وحشی باید مورد توجه برنامه‌ریزان حفاظت قرار گیرند. تصادفات جاده‌ای، گیرکردن در تله هوبره‌گیری به‌صورت تصادفی،شکار به‌دلیل تعارض با مرغداری‌ها و در مواردی تعقیب و کشته‌شدن توسط سگ‌های گله از دیگر عوامل تهدید گربه‌وحشی در ایران ذکر شده‌اند (Ghoddousi و همکاران، ۲۰۱۶). تخریب زیستگاه، معدن‌کاوی، احداث جاده و بزرگراه، دخل و تصرف و تغییر کاربری اراضی و حضور انسان در زیستگاه‌های طبیعی، همگی سبب انتشار گربه‌اهلی به‌داخل زیستگاه‌های گربه‌وحشی و افزایش تماس این دو تاکسون و احتمال اختلاط می‌شوند که جهت حفاظت از خلوص ژنتیکی گربه‌وحشی باید حتی‌الامکان از انتشار گربه اهلی به‌داخل مناطق حفاظت‌شده جلوگیری کرد. ضمن این‌که استفاده از نشانگرهای هسته‌ای توام با نشانگرهای میتوکندریایی و نمونه‌برداری در وسعت بالا از تمامی مناطق حضور گربه‌وحشی ازجمله جنوب‌غرب و شمال‌غرب ایران که احتمال حضور گربه‌وحشی اروپایی دور از انتظار نیست، در تحقیقات آتی، دانش ما را نسبت به گربه‌وحشی و وضعیت هیبریداسیون آن در ایران افزایش خواهد داد. افزایش بهبود کیفیت زیستگاه‌ها از طریق افزایش حفاظت فیزیکی در مناطق حفاظت شده، احتمال نزدیک شدن گربه‌وحشی به جوامع انسانی و جاده‌ها را کاهش می‌دهد که این امر در حفاظت از گربه‌وحشی و جلوگیری از انقراض ژنتیکی این گونه مؤثر است. استفاده از فناوری‌های نوین به‌منظور بررسی‌الگوهای‌حرکتی و مهاجرت گونه و بررسی کریدورهای احتمالی بین ایران و کشورهای همسایه به‌ویژه در شمال‌غرب و شمال‌شرق کشور و هم‌چنین مطالعات رفتارشناسی گونه از دیگر پیشنهادات نویسندگان‌این مقاله است که می‌تواند دانش ما را نسبت به بوم‌شناسی گربه‌وحشی افزایش دهد. ما هیچ اطلاعاتی درباره خطر هیبریداسیون گربه‌وحشی در ایران، فرایند هیبریداسیون گونه، روند و فاکتورهای محیطی و رفتاری تاثیرگذار بر آن نداریم. درجه هیبریداسیون، فراوانی هیبریدها،رفتارشناسی هیبریدهادرمقایسه‌با رفتارشناسی گربه‌وحشی، بررسی شایستگی هیبریدها در طبیعت و این‌که آیا به‌عنوان یک گونه هم‌بوم با گربه‌وحشی می‌توانند درنظر گرفته شوند یا نه، مواردی است که برای حفاظت از گربه‌وحشی باید به آن‌ها پاسخ دهیم. هم‌چنین فراوانی جمعیت‌های گربه‌اهلی در خارج از مراکز مسکونی و یا در حاشیه مناطق حفاظت شده باید به‌دقت مورد پایش قرار گیرد.

منابع

۱. **موسوی، م.؛ رضایی، ح. و نادری، س.، ۱۳۹۷.** پیش‌بینی پراکنش بالقوه گربه‌وحشی *Felis silvestris* با استفاده از الگوریتم حداکثر آنتروپی در ایران. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۰، شماره ۱، صفحات ۱۹ تا ۲۴.

۲. **موسوی، م.؛ رضایی، ح. و نادری، س.، ۱۳۹۹.** روابط فیلوژنتیکی گربه وحشی (*Felis lybica/Felis silvestris*) در ایران با استفاده از ژن میتوکندریایی NADH5 و امکان‌سنجی شناسایی گربه وحشی آسیایی (*F. lybica ornata*) به‌وسیله این نشانگر. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۲، شماره ۲، صفحات ۱ تا ۱۰.

3. **Baca, M.; Popović, D.; Panagiotopoulou, H.; Marciszak, A.; Krajcarz, M.; Krajcarz, M.T.; Daniel Makowiecki, D.; Węgleński, P. and Nadachowski, A., 2018**. Human mediated dispersal of cats in the Neolithic Central Europe. Heredity. Vol. 121, pp: 557-563.

4. **Daniels, M.J.; Beaumont, M.A.; Johnson, P.J.; Balharry, D.; Macdonald, D.W. and Barratt E., 2001**.Ecology and genetics of wild-living cats in the north-east of Scotland and the implication for the conservation of the wildcat. Applied Ecology. Vol. 38, pp: 146-161.

5. **Devillard, S.; Jombart, Th.; Léger, F.; Pontier, D.; Say, L. and Ruette, S., 2014**. How reliable are morphological and anatomical characters to distinguish European wildcats, domestic cats and their hybrids in France? Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. Vol. 52, pp: 154-162.

6. **Duperon, E.B.; Virgos, E.; Moleon, M. and Azcon, J.M.B., 2014.** How accurate are coat traits for discriminating wild and hybrid forms of Felis silvestris? Mammalia. Vol. 79, No. 1, pp: 1-10.

7. **Driscoll, C.A.; Menotti -Raymond, M.; Roca, A.L.; Hupe, K.; Johnson, W.E.; Geffen, E.; Harley, E.; Delibes, M.; Pontier, D.; Kitchener, A.C.; Yamaguchi, N.; O'Brien, S. J. and MacDonald, D., 2007**. The near eastern origin of cat domestication. Science. Vol. 317, pp: 519-523.

8. **Driscoll, C.; Yamaguchi, N.; O'Brien, S.J. and MacDonald, D.W., 2011**. A suite of genetic markers useful in assessing wildcat (*Felis silvestris* spp.) – domestic cat

(*Felis silvestris catus*) admixture. Journal of Heredity. Vol. 102, No. 1, pp: 87-90.

9. **Ghoddousi, A.; Hamidi, A.Kh.; Ghadirian, T. and Baniasadi, S., 2016**. The Status of wildcat in Iran: a Crossroad of Subspecies? Cat-News Special Issue. Vol. 10, pp: 60-63.

10. **Kilshaw, K.; Johnson, P.J.; Kitchener, A.C. and Macdonald, D., 2014**. Detecting the elusive Scottish wildcat *Felis silvestris silvestris* using camera trapping. Oryx. Vol. 49, pp: 1-9.

11. **Kitchener, A.C.; Yamaguchi, N.; Ward, J.M. and Macdonald, D.W., 2005.** A diagnosis for the Scottish wildcat (*Felis silvestris*): a tool for conservation action for a critically-endangered felid. Animal Conservation. Vol. 8, pp: 223-237.

12. **Mattucci, F.; Oliveira, R.; Lyons, L.A.; Alves, P.C. and Randi, E., 2015**. European wildcat populations are subdivided into five main biogeographic groups: consequences of Pleistocene climate changes or recent anthropogenic fragmentation? Ecol E. Vol. 6, No. 1, pp: 3-22.

13. **Monterroso, P.; Brito, J.C.; Ferreras, P. and Alves, P.C., 2009**. Spatial ecology of the European wildcat in a Mediterranean ecosystem: dealing with small radio-tracking datasets in species conservation. Journal of Zoology. Vol. 279, pp: 27-35.

14. **Mousavi, M.; Rezaei, H.R. and Naderi, S., 2019.** Phylogeographic analysis of Iranian wildcats (*Felis lybica / Felis silvestris*) as revealed by mitochondrial cytochrome *b* gene. Zoology in the Middle East. Vol. 65, No. 4, pp: 293-306.

15. **O'Brien, J.; Devillard, S.; Say, L.; Vanthomme, H.; Leger, F.; Ruette, S. and Pontier, D., 2009**. Preserving genetic integrity in a hybridizing world: are European Wildcats (*Felis silvestris silvestris*) in eastern France distinct from sympatric feral domestic cats? Biodiversity and Conservation. Vol. 18, pp: 2351-2360.

16. **Ottoni, C.; Van Neer.; W.; De Cupere, B.; Daligault, J.; Guimaraes, S.; Peters, J.; Spassov, N.; Prendergast, M.E.; Boivin, N.; Morales-Muñiz, A. and Bălăşescu, A., 2017**. The palaeogenetics of cat dispersal in the ancient world. Nature Ecology & Evolution. Vol. 1, pp: 139.

17. **Posada, D., 2008**. JModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution. Vol. 25, pp: 1253-1256.

18. **Pierpaoli, M.; Biro, Z.S.; Herrmann, M.; Hupe, S.K.; Fernandes, M.; Ragni, B.; Szemethy, L. and Randi, E., 2003.** Genetic distinction of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Europe, and hybridization with domestic cats in Hungary. Molecular ecology. Vol. 12, pp: 2585-2598.

19. **Ragni, B. and Possenti, M., 1996**. Variability of coat-colour and markings system in Felis silvestris. Italian Journal of Zoology. Vol. 63, pp: 285-292.

20. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003**. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. Vol. 19, pp: 1572-1574.

21. **Roux, J.; Foxcroft, L.C.; Herbst, M. and MacFadyen, S., 2015.** Genetic analysis shows low levels of hybridization between African wildcats (*Felis silvestris lybica*) and domestic cats (*F. s. catus*) in South Africa. Ecology and Evolution. Vol. 5, No. 2, pp: 288-299.

22. **Sunquist, M. and Sunquist, F., 2002.** Wild cats of the world. The University of Chicago Press, Chicago.

23. **Say, L.; Devillard, S.; Leger, F.; Pontier, D. and Ruette, S., 2012**. Distribution and spatial genetic structure of European wild cat in France. Animal Conservation. Vol. 15, pp: 18-27.

24. **Senn, H.V.; Ghazali, M.; Kaden, J.; Barclay, D.; Harrower, B.; Campbell, R.D.; Macdonald, D.W. and Kitchener, A.C., 2018**. Distinguishing the victim from the threat: SNPbased methods reveal the extent of introgressive hybridization between wildcats and domestic cats in Scotland and inform future in situ and ex situ management options for species restoration. Evolutionary applications. Vol. 12, pp: 399-414.

25. **Stamatakis, A., 2014**. RaxMl Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. Vol. 30, pp: 1312-1313.

26. **Tamada, T.; Kurose, N. and Masuda, R., 2005**. Genetic diversity in domestic Felis catus of the Tsushima islands, Based on Mitochondrial DNA Cytochrome b and Control Region Nucleotide Sequence. Zoological science. Vol. 22, pp: 627-633.

27. **Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. and Kumar, S., 2013**. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution. Vol. 30, pp: 2725-2729.

28. **Veli, E.; Bologna, M.A.; Silvia, C. ;Ragni, B. and Randi, E., 2015.** Non-invasive monitoring of the European wildcat (*Felis silvestris silvestris* Schreber, 1777): comparative analysis of three different monitoring techniques and evaluation of their integration. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

29. **Yamaguchi, N.; Driscoll, Ch.; Kitchener, A.C.; Ward, J.M. and Macdonald, D.W., 2004.** Craniological differentiation between European wildcats (*Felis silvestris silvestris*), African wildcats (*F. s. lybica*) and Asian wildcats (*F. s. ornata*): implications for their evolution and conservation. Biological Journal of the Linnean Society. Vol. 83, pp: 47-63.

30. **Zwijacz-Kozica, T.; Wazna, A.; Munoz-Fuentes, V. and Tiesmeyer, A., 2017**. Not European Wildcats, But Domestic Cats Inhabit Tatra National Park. Polish Journal of Ecology. Vol. 65, No. 4, pp: 415-421.