

D5.1 Γενετική μελέτη και επανεκτίμηση του πληθυσμού αρκούδας στην περιοχή της Φλώρινας

Action D5.1 Technical report that includes data and results on population and distribution trends of the targeted species



OCTOBER 2020

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, το Πράσινο Ταμείο και τους εταίρους του έργου στο πλαίσιο του Προγράμματος Επιχορηγήσεων LIFE «Φύση και Βιοποικιλότητα»



Δήμος Αμυνταίου
Γρ. Νικολαΐδη 2,
ΑΜΥΝΤΑΙΟ

Δικαιούχοι Έργου:



Ομάδα εργασίας:

Σύνταξη/επιμέλεια κειμένου: Καραϊσκού Νικολέτα (Διδάκτωρ Γενετικής, επιστημονικός συνεργάτης, Καλλιστώ)

Ομάδα μελέτης:

Αλέξανδρος Τριανταφυλλίδης (Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Πληθυσμών, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ)

Νικολέτα Καραϊσκού (Διδάκτωρ Βιολογίας - Γενετικής, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ)

Γιώργος Μερτζάνης (Διδάκτωρ Βιολογίας - Ζωολογίας, επιστημονικός υπεύθυνος, Καλλιστώ)

Κώστας Γκαγκαβούζης (Διδάκτωρ Βιολογίας - Γενετικής, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ)

Μαρία Τσαλκιτζίδου (Πτυχιούχος του Τμήματος Βιολογίας, ΑΠΘ)

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Summary	2
1. Εισαγωγή	3
2. Μεθοδολογία.....	4
3. Αποτελέσματα	8
4. Συζήτηση	14
5. Συμπεράσματα.....	17

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Ακολουθία εκκινητών και μέγεθος των 10 μικροδορυφορικών τόπων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.....	5
Πίνακας 2: Συγκέντρωση των εκκινητών στην πολλαπλή αντίδραση	6
Πίνακας 3: Ακολουθία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση φύλου	6
Πίνακας 4: Σύνθετος γονότυπος για 10 μικροδορυφορικούς τόπους για τα 56 διαφορετικά άτομα αρκούδας που εντοπίστηκαν. Στην τελευταία στήλη χαρακτηρίζεται το φύλο κάθε ατόμου	9
Πίνακας 5: Τα 35 άτομα για τα οποία υπήρξαν επανασυλλήψεις. Αναφέρεται η μέγιστη χιλιομετρική απόσταση μεταξύ των συλλήψεων.....	11
Πίνακας 6: Αριθμός αλληλομόρφων (A), Μέγεθος αλληλομόρφων σε bp (R), Παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (Ho), Αναμενόμενη ετεροζυγωτία (He), Τιμή πιθανότητας για το τεστ Hardy-Weinberg (pHW), δείκτης ενδογαμίας (Fis), Πιθανότητα μηδενικών αλληλομόρφων (null alleles) (F(null)), πληροφορία που περιέχεται στους πολυμορφισμούς των τόπων (polymorphic information content (PIC)) για τον πληθυσμό της καφέ αρκούδας στην περιοχή του Αμυνταίου.	13
Πίνακας 7. Συγκριτικός πίνακας μεταξύ των πληθυσμών των Γρεβενών, της Καστοριάς, της Ροδόπης και του Αμύνταιου για το μέσο αριθμό των αλληλομόρφων (A), την μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (Ho), το πληθυσμιακό μέγεθος (Nc) και το δραστικό μέγεθος (Ne)	15

Περίληψη

Η παρούσα τεχνική αναφορά, αφορά στην δράση D5 - υποδράση D5.1 του έργου LIFE15NAT/GR/001108 (LIFE AmyBear) η οποία στοχεύει σε μια συγκριτική επανεκτίμηση της πληθυσμιακής κατάστασης του στοχευόμενου είδους (*Ursus arctos*) στην περιοχή του έργου (αλλά και στην ευρύτερη περιοχή της ΠΕ Φλώρινας πλην της περιοχής της ΕΠ Πρεσπών) (3) χρόνια μετά την πρώτη εκτίμηση της πληθυσμιακής κατάστασης που έγινε το 2017 (δράση A2). Ο λόγος που έγιναν (2) διαδοχικές εκτιμήσεις της πληθυσμιακής κατάστασης της καφέ αρκούδας με την συγκεκριμένη χρονική απόσταση δηλ. μία στην αρχή και μία προς το τέλος του έργου, ήταν για να διαπιστωθεί εάν έχουν υπάρξει κάποιες μεταβολές και εάν αυτές μπορούν να συναρτηθούν με την θετική επίδραση κυρίως των δράσεων διατήρησης (C) που εφαρμόστηκαν στο πλαίσιο του έργου, χωρίς να υπο-εκτιμάται η θετική επίδραση των δράσεων (E) που στόχευε με άλλες πρακτικές σε μια πλειάδα ομάδων αναφοράς. Αναφερόμαστε ειδικότερα σε συγκεκριμένες δράσεις της δέσμης (C) η εφαρμογή των οποίων ξεκίνησε σχεδόν από την αρχή του έργου και οι οποίες στόχευαν με πολύ πρακτικά μέτρα και παρεμβάσεις στην άμβλυση των αρνητικών αλληλεπιδράσεων ανθρώπου-αρκούδας: δράση C4/C8 (Ομάδα Άμεσης Επέμβασης και χρήση αποτρεπτικών μέσων), δράση C5 (χορήγηση Σκύλων Φύλαξης Κοπαδιών - ΣΦΚ) αλλά και σε δράσεις η εφαρμογή των οποίων ξεκίνησε το 2019 (C6) αλλά και μέσα στο 2020 (C3, C7). Με βάση τα αποτελέσματα που παρατίθενται διαπιστώνεται μια θετική μεταβολή στην πληθυσμιακή κατάσταση του στοχευόμενου είδους σε σχέση με τους αρχικούς δείκτες, γεγονός που συνηγορεί στην θετική και συνδυαστική επίδραση της δέσμης των δράσεων (C).

Summary

This deliverable under Action D5.1 aims at comparatively reassessing the population status of the target species (*Ursus arctos*) in the project area (but also in the wider area of the Regional Unit of Florina except for the area of the Society for the Protection of Prespa) (3) years after the first estimation of bear's population that took place in 2017 (action A2). The reason for the implementation of (2) successive estimates of the brown bear population at these specific time periods, i.e., one at the beginning and one at the end of the project, was to determine if there had been any changes and if these could be related to the positive effect mainly of conservation actions (C) implemented within the project, without underestimating the positive effect of (E) actions targeted by other practices on a number of reference groups. In particular, we refer to specific actions of (C), the implementation of which started almost from the beginning of the project and which aimed at very practical measures and interventions in mitigating the negative human-bear interactions: action C4 / C8 (Bear Emergency Team and use of deterrents), action C5 (distribution of Livestock Guarding Dogs - LGDs), but also in actions whose implementation began in 2019 (C6) and in 2020 (C3, C7). Based on the results presented, a positive trend is found in the population status of the target species in relation to the initial indicators, which proves the positive and combined effect of the set of actions (C).

1. Εισαγωγή

Η χρήση γενετικών μεθόδων σε συνδυασμό με τεχνικές μη παρεμβατικής δειγματοληψίας για την εκτίμηση των πληθυσμιακών μεγεθών απειλούμενων ή σπάνιων θηλαστικών αποτελεί τα τελευταία χρόνια κοινή ερευνητική πρακτική σε διεθνές επίπεδο (Kohn & Wayne 1997, Kohn *et al.* 1999, Bellemain *et al.* 2005, Waits & Paetkau 2005, Luikart *et al.* 2010). Τα σημαντικότερα συγκριτικά πλεονεκτήματα τέτοιων μεθοδολογικών προσεγγίσεων (έναντι των παραδοσιακών) είναι η μηδενική όχληση που προκαλείται στους εξεταζόμενους πληθυσμούς και η δυνατότητα συγκέντρωσης επαρκούς αριθμού δειγμάτων ακόμη και σε περιπτώσεις έντονα κρυπτικών ειδών που παρουσιάζουν χαμηλές πληθυσμιακές πυκνότητες. Η αρκούδα αποτελεί ένα από τα είδη στα οποία η μη παρεμβατική συλλογή γενετικών δειγμάτων (τριχες, περιττώματα) έχει αξιοποιηθεί κατά κόρον τα τελευταία χρόνια σε μελέτες πληθυσμιακής οικολογίας και γενετικής πληθυσμών (Taberlet *et al.* 1997, Gervasi *et al.* 2008, Pérez *et al.* 2009, De Barba *et al.* 2010, Karamanlidis *et al.* 2012)

Η ερευνητική ομάδα της Καλλιστώς σε συνεργασία με το Εργαστήριο Γενετικής Πληθυσμών του ΑΠΘ και στα πλαίσια του προγράμματος LIFE που εκπονήθηκε στην περιοχή του Αμύνταιου (Improving Human-Bear Coexistence Conditions in Municipality of Amyntaio – “LIFE AMYBEAR” – LIFE15NAT/GR/001108), διεξήγαγε το 2017 γενετική μελέτη του πληθυσμού αρκούδας στην περιοχή ακολουθώντας συγκεκριμένη μεθοδολογία γενετικής ταυτοποίησης μετά από συλλογή δειγμάτων κυρίως τριχών και περιττωμάτων. Η μελέτη αυτή επέτρεψε την εκτίμηση του ελάχιστου πληθυσμού αρκούδας τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο στην περιοχή μελέτης. Επιπρόσθετα, με τη εφαρμογή σύγχρονων στατιστικών προγραμμάτων επιχειρήθηκε μια πρώτη εκτίμηση της συνολικής αφθονίας.

Ο ελάχιστος πληθυσμός, όπως προέκυψε από τη γενετική ταυτοποίηση, ανέρχεται σε 56 άτομα. Η εκτίμηση αφθονίας που προέκυψε από το πρόγραμμα CAPWIRE (Miller *et al.*, 2005) είναι σημαντικά υψηλότερη, ανεβάζοντας το μέγεθος του πληθυσμού στα 154 άτομα περίπου (95% CI=163-264). Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ωστόσο θα πρέπει να αντιμετωπιστεί μάλλον με επιφυλακτικότητα. Οι δημιουργοί του στατιστικού προγράμματος υποστηρίζουν ότι ακριβείς εκτιμήσεις προκύπτουν με τιμές σύλληψης/άτομο της τάξης κοντά στο 2 (βλ. Miller *et al.* 2005). Στην παρούσα μελέτη η πλειοψηφία των ατόμων συνελήφθη μόλις μία φορά. Όπως προτείνεται, εντατικότερη δειγματοληψία (αύξηση του αριθμού των δειγμάτων) θα μπορούσε μελλοντικά να επιβεβαιώσει το ακριβές μέγεθος του πληθυσμού καθώς οι σημειακές εκτιμήσεις του πληθυσμιακού μεγέθους που λαμβάνονται με μόλις μία έρευνα έχουν χαμηλή διαχειριστική αξία αφού αποτελούν ουσιαστικά μια στιγμιαία απεικόνιση του πληθυσμού (snapshot).

Σκοπός, λοιπόν της δεύτερης φάσης του προγράμματος είναι η γενετική ταυτοποίηση ατόμων και η επανεκτίμηση του μεγέθους του πληθυσμού της αρκούδας στην περιοχή του Αμύνταιου στηριζόμενοι στη γενετική ανάλυση νέων δειγμάτων τριχών με τη χρήση 10 μικροδορυφορικών τόπων.

2. Μεθοδολογία

Δειγματοληψία

Στην παρούσα μελέτη συμπεριελήφθησαν δείγματα τριχών τα οποία συλλέχθηκαν από το μόνιμο δίκτυο τριχοπαγίδων (περιελιγμένο αγκαθωτό σύρμα), οι οποίες εγκαταστάθηκαν σε στύλους της ΔΕΗ. Επιλέχθηκαν κυρίως στύλοι για τους οποίους υπήρχαν σαφείς ενδείξεις πρόσφατης χρήσης από αρκούδες (π.χ. εμφανή σημάδια από δαγκωματιές, νυχιές, λάσπη ή τρίχες). Στους στύλους αυτούς είχε προηγηθεί δειγματοληψία (Απριλίου-Μαΐου 2017), δεδομένα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη προσπάθεια για εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους του πληθυσμού της αρκούδας στην περιοχή Αμύνταιου (Πατρωνίδης Πόλης, Μεταπτυχιακή Εργασία). Για την παρούσα ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν νέες δειγματοληψίες από τον Ιούνιο μέχρι τον Σεπτέμβριο του 2019 όπου συνολικά συλλέχθηκαν 255 δείγματα.

Εξαγωγή DNA και γενετική ταυτοποίηση με την ενίσχυση μικροδορυφορικών δεικτών

Για την εξαγωγή του γενετικού υλικού (DNA) από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο πρωτόκολλο και κιτ απομόνωσης (QIAamp® DNA Mini). Στα δείγματα τριχών, αρχικά γίνεται αποκοπή των ριζών ύστερα από παρατήρηση στο στερεοσκόπιο και μεταφορά τους σε σωλήνες erppendorf 1,5ml. Ο αριθμός των ριζών που αποκόπτονται σε κάθε δείγμα ποικίλει (1-30 ρίζες/ δείγμα) αναλόγως με την ποιότητα του δείγματος και τον τρόπο συλλογής του και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ποσότητα και την ποιότητα του απομονωμένου DNA. Αφού αποκοπούν οι ρίζες από κάθε δείγμα ακολουθείται το πρωτόκολλο απομόνωσης που προτείνει ο κατασκευαστής. Επειδή η ποσότητα του απομονωμένου DNA από τα δείγματα τριχών είναι ιδιαίτερα μικρή, δεν έγινε ηλεκτροφόρησή του για τον έλεγχο της επιτυχίας της απομόνωσης. Για να ελεγχθεί η επιτυχία της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε πρώτα αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για όλα τα δείγματα και έπειτα ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή αγαρόζης 1,5% w/v.

Για την γενετική ταυτοποίηση των δειγμάτων (DNA fingerprinting) χρησιμοποιήθηκαν 10 ζεύγη μικροδορυφορικών μοριακών δεικτών που ενισχύθηκαν με PCR (G10C, G10P, G1A, G10X, G1D, G10H, G10L, Mu50, Mu59, Mu26) (Πίνακας 1). Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα πιθανά λάθη γενοτύπησης στα δείγματα DNA από τρίχες εφαρμόστηκε η μέθοδος πολλαπλών σωλήνων (multi-tube approach) σύμφωνα με τους Adams και Waits (2007). Οι συνθήκες ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: αποδιάταξη στους 94°C για 5min, 35 κύκλοι στους 94°C για 30sec, υβριδισμός εκκινητών στους 58°C για 45sec και επιμήκυνση στους 72°C για 1min. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε τους 72°C για 5min. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 10μl, που περιλάμβανε 1μl από 10x Reaction Buffer, 0,1μl από 10x BSA, 0,25 mM dNTPs, 1 p/μl από κάθε εκκινητή και περίπου 50ng από μητρικό DNA. Επιπλέον, 0.4 units of Taq πολυμεράση και 2mM MgCl₂ χρησιμοποιήθηκαν. Έλεγχος των προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5%.

Στη τελική ενίσχυση, οι τόποι ενισχύθηκαν σε πολλαπλή αντίδραση (Multiple reaction) ώστε να μειωθεί ο συνολικός αριθμός των αντιδράσεων και ο αριθμός των αναλωσίμων. Η πολλαπλή PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 μl και περιλάμβανε 5 μl από Qiagen Buffer από το Qiagen multiplex PCR kit, κατάλληλης συγκέντρωσης εκκινητές (1 p/μl) και 30 ng DNA. Οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν ως εξής: αποδιάταξη στους 95°C για 15 min, 35 κύκλοι στους 94°C για 30 sec, υβριδισμός στους 57°C για 1,5 min, επιμήκυνση στους 72°C για 1 min και τελική ενίσχυση στους 60 °C για 15 min.

Πίνακας 1: Ακολουθία εκκινητών και μέγεθος των 10 μικροδορυφορικών τόπων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Ακολουθία εκκινητών		Μέγεθος ενισχυμέν ου τμήματος	Βιβλιογραφία
G10H F	5'-CCCAACAAGAAGACCACTGTAA-3'	221-257	Paetkau <i>et al.</i> , 1998
G10H R	5'-CCAGAGACCACCAAGTAGGATA-3'		
G10L F	5'-TGTA CTGATTTAATT CACATTTCCC-3'	153-163	Paetkau <i>et al.</i> 1995
G10L R	5'-GAAGATACAGAAACCTACCCATGC-3'		
Mu50 F	5'-GTCTCTGTCATTTCCCCATC-3'	110-130	Bellemain and Taberlet, 2004
Mu50 R	5'-AACCTGGAACAAAAATTAACAC-3'		
Mu26 F	5'-GCCTCAAATGACAAGATTTTC-3'	182-200	Taberlet <i>et al.</i> 1997
Mu26 R	5'-TCAATTTAAAATAGGAAGCAGC-3'		
G10P F	5'-TACATAGGAGGAAGAAAGATGG-3'	145-159	Paetkau <i>et al.</i> 1995
G10P R	5'-AAAAGGCCTAAGCTACATCG-3'		
Mu59 F	5'-TGCTGCTTTGGGACATTGTAA-3'	219-251	Taberlet <i>et al.</i> 1997
Mu59 R	5'-CAATCAGGCATGGGGAAGAA-3'		
G10C F	5'-AAAGCAGAAGGCCTTGATTTCCCTG-3'	97-116	Paetkau <i>et al.</i> 1995
G10C R	5'-GGGACATAAACACCCGAGACAGC-3'		
G1D F	5'-ATCTGTGGGTTTATAGGTTACA-3'	172-184	Paetkau <i>et al.</i> 1995
G1D R	5'-CTACTCTTCCTACTCTTTAAGAG-3'		
G10X F	5'-CCCTGGTAACCACAAATCTCT-3'	132-154	Paetkau <i>et al.</i> 1998
G10X R	5'-TCAGTTATCTGTGAAATCAAAA-3'		Taberlet <i>et al.</i> 1997
G1A F	5'-GACCCTGCATACTCTCCTCTGATG-3'	180-190	Paetkau <i>et al.</i> 1995
G1A R	5'-GCACTGTCCTGCGTAGAAGTGAC-3'		

Πίνακας 2: Συγκέντρωση των εκκινητών στην πολλαπλή αντίδραση

Panel A	
G10H	0.8 pmol/μl
G1D	1 pmol/μl
G10X	1 pmol/μl
Mu26	1 pmol/μl
Panel B	
G1A	1 pmol/μl
G10P	2 pmol/μl
G10C	1 pmol/μl
Panel C	
Mu59	1 pmol/μl
G10L	1 pmol/μl
MU50	1 pmol/μl

Για τον προσδιορισμό του φύλου χρησιμοποιείται η μέθοδος των Pages *et al.* (2009), που στηρίζεται στη χρήση δύο ειδικών για την αρκούδα μοριακών δεικτών, ενός για το Y χρωμόσωμα (SRY gene) και ενός που χρησιμεύει ως μάρτυρας για την αντίδραση PCR (ZF gene) (Πίνακας 3). Οι συνθήκες ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι: αποδιάταξη στους 94°C για 5min, 40 κύκλοι στους 94°C για 30sec, υβριδισμός εκκινητών στους 55°C για 30sec και επιμήκυνση στους 72°C για 45sec. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε τους 72°C για 7min. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 20μl, και περιλαμβάνει 2μl από 10x Reaction Buffer, 0,2μl από 10x BSA, 0.25 mM dNTPs, 1 pmol/μl από κάθε εκκινητή SRY, 6 pmol/μl από κάθε εκκινητή ZF και περίπου 50-100ng του γενωματικού DNA. Έλεγχος των προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1,5%. Αν το άτομο είναι θηλυκό θα εμφανίσει μόνο μια ζώνη (ZF gene), αν είναι αρσενικό θα εμφανίσει δυο ζώνες (SRY gene & ZF gene).

Πίνακας 3: Ακολουθία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση φύλου

Ακολουθία εκκινητών		Μέγεθος ενισχυμένου τμήματος (bp)
MP-SRY-F	5-TGGTCTCGTGATCAAAGGCGC-3	115
MP-SRY-R	5-GCCATTTTTCGGCTTCCGTAAG-3	
MP-ZF-F	5-GACAGCTGAACAAGGGTTG-3	144
MP-ZF-R	5-GCTTCTCGCCGGTATGGATG-3	

Εκτίμηση πληθυσμιακού μεγέθους και γενετικές αναλύσεις

Ο προσδιορισμός των διαφορετικών ατόμων και επομένως ο υπολογισμός του ελάχιστου αριθμού αρκούδων στην περιοχή έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος DROPOUT (McKelvey & Schwartz 2005). Το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού υπολογίστηκε με το πρόγραμμα NeESTIMATOR 1.3 (Peel *et al*, 2004). Η τιμή του Ne υπολογίστηκε με την χρήση της επιλογής “linkage disequilibrium method”.

Η τιμή του Nc υπολογίστηκε με το πρόγραμμα CAPWIRE (Miller *et al*, 2005). Στο πρόγραμμα μπορεί να γίνει εισαγωγή δεδομένων τα οποία περιλαμβάνουν πολλαπλές παρατηρήσεις του ίδιου ατόμου από μια μόνο δειγματοληψία. Ο υπολογισμός του πληθυσμού, από το πρόγραμμα, έχει δείχθει ότι είναι αξιόπιστος με την χρήση των συγκεκριμένων τύπου δεδομένων για μικρούς πληθυσμούς (<100 άτομα) με ετερογένεια σύλληψης. Η έννοια ετερογένεια σύλληψης σημαίνει ότι όλα τα άτομα δεν έχουν τι ίδιες πιθανότητες να συλληφθούν κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας. Η ετερογένεια σύλληψης στην παρούσα έρευνα προκύπτει κυρίως από τον τρόπο συλλογής των δειγμάτων (στύλοι της ΔΕΗ) (Karamanlidis *et al*, 2008, 2010). Το μικρό μέγεθος του υπό μελέτη πληθυσμού και η ετερογένεια σύλληψης, οδήγησαν στην χρήση του μοντέλου “two innate rates model” για τον υπολογισμό του πληθυσμιακού μεγέθους (Miller *et al*, 2005).

Με το πρόγραμμα GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset 1995) υπολογίστηκαν βασικές παράμετροι της γενετικής ποικιλότητας του εξεταζόμενου πληθυσμού όπως η παρατηρούμενη (H_o) και η αναμενόμενη (H_{ex}) ετεροζυγωτία, ο δείκτης ομομιξίας (FIS) και η απόκλιση από ισορροπία Hardy-Weinberg.

3. Αποτελέσματα

Επανεκτίμηση πληθυσμιακού μεγέθους

Στην παρούσα μελέτη, ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων τριχών που προσκομίσθηκαν στο εργαστήριο ήταν 255. Στο συγκεκριμένο βιολογικό υλικό, η ποιότητα των τριχών είναι αυτή που καθορίζει και την απόδοση της τεχνικής της ενίσχυσης της PCR. Έτσι, το 10% των τριχών δεν είχε καμία ή μια ρίζα (25 δείγματα). Παρόλη την άσχημη κατάσταση των συγκεκριμένων δειγμάτων, έγινε προσπάθεια για απομόνωση DNA και ακολούθησε έλεγχος με την τεχνική της PCR σε κάποιους μικροδορυφορικούς τόπους. Όπως όμως ήταν αναμενόμενο δεν υπήρχε κανένα θετικό αποτέλεσμα και έτσι δεν συμπεριελήφθησαν τα δείγματα αυτά στην περαιτέρω μελέτη.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα 230 δείγματα, τα 75 (33%) είχαν από 2-3 ρίζες σχετικά κακής ποιότητας (αποχρωματισμένες από την ηλιακή ακτινοβολία), ενώ τα υπόλοιπα 155 δείγματα είχαν από 4 και πάνω ρίζες μέτριας έως και καλής ποιότητας. Από τα 155 αυτά δείγματα, στα 110 δείγματα ενισχύθηκε τουλάχιστον ένας τόπος από κάθε Panel. Παρόλα αυτά, για την αξιοπιστία των αναλύσεων, συμπεριελήφθησαν μόνο δείγματα που ενισχύθηκαν επιτυχώς τουλάχιστον σε 6 τόπους. Έτσι, συνολικά χρησιμοποιήθηκαν **80 δείγματα** για περαιτέρω αναλύσεις με τα 68 από αυτά να έχουν γενοτυπηθεί σε 8-10 τόπους.

Συνολικά αναγνωρίστηκαν **56 διαφορετικά άτομα** με βάση τον σύνθετο γονότυπο τους για τους 10 μικροδορυφορικούς τόπους (βλ. Πίνακα 4). Το φύλο προσδιορίστηκε με επιτυχία σε 46 άτομα και βρέθηκε ότι τα αρσενικά υπερτερούσαν από τα θηλυκά (28 αρσενικά/ 18 θηλυκά). Αναλυτικά, τα άτομα και το φύλο τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Από τα 80 άτομα που γενοτυπήθηκαν επιτυχώς, τα 45 άτομα/γενότυποι ήταν μοναδικά, δηλαδή η γενετική ταυτοποίηση επιτεύχθηκε από μόλις ένα δείγμα, δηλαδή από μία και μοναδική «σύλληψη» κατά τη διάρκεια της μελέτης. Για τα υπόλοιπα 35 δείγματα ο αριθμός των «συλλήψεων» κυμάνθηκε από 2 έως 5.

Πίνακας 4: Σύνθετος γονότυπος για 10 μικροδορυφορικούς τύπους για τα 56 διαφορετικά άτομα αρκούδας που εντοπίστηκαν. Στην τελευταία στήλη χαρακτηρίζεται το φύλο κάθε ατόμου

	G10H		Mu26		G1D		G10X		G1A		G10P		G10C		MU59		G10L		MU50		Φύλο
16	258	258			174	186	138	146	177	181	140	156	108	108	219	224	152	170	107	109	αρσενικό
17	258	258	0	0	174	186	138	146	177	181	156	156	0	0	219	224	152	170	107	109	θηλυκό
23	224	234	184	192	178	178	138	146	177	177	140	152	102	106	219	219	164	168	109	111	αρσενικό
26	258	258	0	0	174	186	138	146	177	181	140	156	102	108	219	224	152	168	107	109	θηλυκό
27	258	258	0	0	174	186	138	146	177	181	140	156	108	108	219	227	152	170	107	109	αρσενικό
35	258	258	184	184	174	182	138	138	181	181	150	152	104	108	219	243	152	168	105	107	θηλυκό
50	258	258	184	188	178	178	138	138	181	181	148	152	108	112	0	0	0	0	0	0	
57	226	258	184	184	178	186	138	138	177	181	148	148	0	0	227	251	152	168	105	107	αρσενικό
58	228	258	184	184	178	186	138	138	177	181	0	0	96	108	227	251	152	168	105	107	αρσενικό
93	258	258	184	184	186	186	138	146	177	181	144	148	96	106	227	251	152	168	107	109	θηλυκό
94	0	0	184	184	0	0	0	0	177	181	144	148	100	106	219	227	168	168	105	109	θηλυκό
107	258	258	0	0	174	182	138	138	181	181	150	152	104	108	219	243	152	168	107	107	αρσενικό
116	258	258	192	192	178	186	138	138	183	183	144	156	100	108	251	251	164	164	109	111	αρσενικό
121	226	234	188	188	182	182	138	138	181	181	156	156	108	112	219	219	168	168	105	107	αρσενικό
122	226	234	188	202	182	182	138	138	181	181	0	0	108	108	219	219	168	168	105	107	θηλυκό
124	228	234	188	188	182	182	136	136	181	181	156	156	108	110	219	219	168	168	105	107	αρσενικό
129	0	0	184	188	0	0	0	0	177	181	150	152	106	106	219	219	168	168	105	109	θηλυκό
132	234	260	188	188	180	186	138	138	177	181	148	150	100	104	0	0	152	168	109	111	αρσενικό
133	234	238	0	0	180	182	138	154	177	177	148	156	104	106	219	219	152	168	105	107	θηλυκό
141	0	0	202	202	0	0	0	0	177	193	0	0	100	106	227	227	168	168	107	109	
151	234	258	184	192	178	180	138	154	177	181	144	144	100	100	224	224	168	168	105	109	αρσενικό
164	258	258	192	192	186	186	136	146	177	181	140	140	102	108	219	224	152	162	109	109	αρσενικό
166	226	234	184	184	0	0	138	138	177	177	148	152	104	110	219	224	152	168	107	109	αρσενικό
167	258	258	192	192	186	186	138	146	177	181	140	140	108	108	219	227	152	162	107	109	αρσενικό
169	258	258	192	192	182	186	138	154	177	181	152	156	104	108	219	241	152	152	105	105	αρσενικό
179	258	258	184	192	174	182	138	146	177	181	150	150	100	108	219	219	168	168	105	107	θηλυκό
180	234	258	0	0	182	186	138	154	181	193	152	152	108	110	219	219	162	168	109	111	
181	0	0	188	188	0	0	0	0	181	181	156	156	100	100	219	219	168	168	107	107	αρσενικό
182	0	0	0	0	0	0	0	0	181	181	156	156	108	110	219	219	168	168	107	107	
183	0	0	184	188	0	0	0	0	181	185	150	156	106	108	219	224	152	168	107	109	
186	226	234	184	184	182	182	138	138	181	181	156	156	108	110	219	219	168	168	105	107	αρσενικό
194	0	0	184	192	0	0	0	0	177	181	144	144	100	100	224	224	168	170	105	109	θηλυκό
197	0	0	184	192	0	0	0	0	177	181	144	144	100	100	227	227	168	170	103	109	θηλυκό
198	226	258	0	0	180	182	138	138	177	177	140	156	0	0	219	227	152	168	107	109	θηλυκό
199	226	258	184	184	180	182	138	138	177	177	140	156	108	110	219	227	152	168	109	109	αρσενικό
200	226	234	184	184	182	182	138	146	177	177	148	152	100	108	219	224	152	168	107	109	αρσενικό
201	0	0	184	184	0	0	0	0	177	181	148	148	102	108	219	219	162	168	105	109	αρσενικό
203	0	0	184	188	0	0	0	0	177	181	156	156	108	108	224	224	162	168	105	109	αρσενικό
205	234	260	184	192	186	186	138	138	177	177	140	156	102	106	219	219	152	168	105	105	θηλυκό
206	226	234	184	184	186	186	138	154	177	181	140	144	100	106	219	219	152	168	105	109	αρσενικό
208	0	0	0	0	0	0	0	0	177	177	140	156	108	108	219	219	152	168	103	105	
213	0	0	0	0	0	0	0	0	177	181	144	144	102	110	219	219	162	170	109	109	
225	0	0	0	0	0	0	0	0	181	185	148	148	102	108	219	224	152	152	105	107	
226	224	258	184	184	178	186	138	138	177	181	144	148	100	106	219	251	152	168	105	105	αρσενικό
233	258	258	0	0	182	186	138	138	177	181	150	152	106	106	239	239	168	168	0	0	θηλυκό
235	238	258	0	0	186	186	146	154	177	185	140	150	104	108	224	251	168	168	107	109	αρσενικό
236	0	0	0	0	0	0	0	0	177	181	148	148	102	104	219	239	152	168	107	111	
238	0	0	0	0	0	0	0	0	177	181	148	150	100	104	219	239	152	168	109	111	
240	234	260	0	0	180	186	136	136	177	181	148	150	100	104	219	239	152	168	109	111	θηλυκό
241	226	258	0	0	182	186	138	154	177	181	144	144	100	110	219	219	164	170	107	109	αρσενικό
242	258	258	184	184	178	182	138	138	177	177	144	148	106	110	219	219	152	168	107	107	αρσενικό
243	226	258	202	202	182	186	138	154	177	181	144	144	100	110	219	219	164	170	107	109	αρσενικό
247	234	234	184	184	174	178	138	138	177	181	146	154	100	108	219	219	162	170	109	109	θηλυκό
253	258	258	0	0	182	186	138	154	177	181	0	0	102	106	219	241	152	152	105	105	θηλυκό
255	234	258	184	184	186	186	138	138	177	181	0	0	104	106	219	219	152	168	107	107	αρσενικό
254	224	232	188	202	180	186	136	136	177	177	140	152	106	110	219	243	0	0	0	0	θηλυκό

Καθώς σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η επανεκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους της περιοχής του Αμύνταιου, στην ανάλυση θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν και τα 75 δείγματα που μελετήθηκαν το 2017, στα πλαίσια του παραδοτέου 1 του προγράμματος AMYBEAR. Η σύγκριση αυτή αποσκοπεί στο να

αυξηθεί ο αριθμός των επανασυλλήψεων και έτσι να γίνει πιο σωστή εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους. Η αξιόπιστη εκτίμηση των επανασυλλήψεων αυξάνει ανάλογα με τον αριθμό των εξεταζόμενων μικροδορυφορικών τόπων. Στις δυο δειγματοληπτικές περιόδους (2017 και 2019) ενισχυθήκαν μόνο 6 κοινοί τόποι, ανάμεσα στο σύνολο των 155 δειγμάτων και μάλιστα κάποιοι από αυτούς τους τόπους δεν έχουν ιδιαίτερο πολυμορφισμό, όπως π.χ. ο G10X, ενώ παράλληλα το μεγαλύτερο μέρος των δειγμάτων που συλλέχθηκαν το 2019 γενοτυπήθηκαν σε 8-10 τόπους. Έτσι, η εκτίμηση έγινε χωριστά για τη δεύτερη δειγματοληπτική περίοδο και στη συνέχεια ακολούθησε σύγκριση με τα αποτελέσματα της πρώτης περιόδου.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, για τα 35 δείγματα με επανασυλλήψεις, τα περισσότερα δείγματα επανασυλλήφθηκαν δύο φορές ενώ κάποια δείγματα φτάσανε και τις πέντε φορές. Οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων «επανασύλληψης» κυμάνθηκαν από λίγα μέτρα έως 10,5 χιλιόμετρα.

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι στην περιοχή του Αμύνταιου ο πληθυσμός της αρκούδας κατά την περίοδο 2017 ανέρχονταν σε τουλάχιστον **56 άτομα (ελάχιστος πληθυσμός)**.

Η σημειακή εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού που προέκυψε με βάση τον αριθμό των «επανασυλλήψεων» και την εφαρμογή του προγράμματος CAPWIRE είναι **161 άτομα**. Τα 95% όρια εμπιστοσύνης για τη συγκεκριμένη εκτίμηση είναι **135 το ελάχιστο και 271 το μέγιστο**. Ο υπολογισμός του δραστικού μεγέθους (Ne) έγινε με το πρόγραμμα NeEstimator. Το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού της καφέ αρκούδας στην περιοχή του Αμυνταίου για το 2019 με βάση τα δεδομένα της παρούσας έρευνας υπολογίστηκε σε 35 άτομα. Ο υπολογισμός του δραστικού μεγέθους με διάστημα εμπιστοσύνης 95% έδειξε ότι το δραστικό μέγεθος είναι μεταξύ 29 και 49,9. Το νούμερο αυτό είναι χαμηλότερο, από τη εκτίμηση που έγινε την περίοδο 2017 (44,4 άτομα με διάστημα εμπιστοσύνης 95% έδειξε ότι το δραστικό μέγεθος είναι μεταξύ 26,1 και 94,4). Επειδή όμως τα όρια εμπιστοσύνης είναι πολύ στενότερα στην εκτίμηση της παρούσας μελέτης, φαίνεται ότι το δραστικό μέγεθος **δεν ξεπερνά τα 50 άτομα**.

Πίνακας 5: Τα 35 άτομα για τα οποία υπήρξαν επανασυλλήψεις. Αναφέρεται η μέγιστη χιλιομετρική απόσταση μεταξύ των συλλήψεων

Αρκούδα	1 ^η σύλληψη	2 ^η σύλληψη	3 ^η σύλληψη	4 ^η σύλληψη	5 ^η σύλληψη	είδος δείγματος
35	4/6/2019	30/8/2019 2,5 km				τρίχες
116	28/5/2019	5/6/2019 ίδιος στύλος				τρίχες
121	28/5/2019	28/5/2019 0,01 km	25/6/2019 3,7 km	25/6/2019 3,7 km	27/8/2019 4,5 km	τρίχες
132	28/5/2019	26/8/2019 0,01 km	26/8/2019 0,01 km			τρίχες
151	29/5/2019	24/6/2019 1,3 km				τρίχες
169	28/5/2019	25/6/2019 1 km	27/8/2019 7,6 km	27/8/2019 7,6 km		τρίχες
179	25/6/2019	25/6/2019 0,01 km				τρίχες
186	25/6/2019	26/8/2019 3,7 km				τρίχες
200	28/5/2019	24/6/2019 5,5 km				τρίχες
240	26/8/2019	26/8/2019 0,01 km				τρίχες
241	28/5/2019	24/6/2019 10,6 km	25/6/2019 8,1 km	27/8/2019 6,8 km	27/8/2019 6,9km	τρίχες
247	24/6/2019	24/6/2019 0,01 km	26/6/2019 0,01 km	27/8/2019 0,7 km		τρίχες

Γενετικές αναλύσεις

Όλοι οι μικροδορυφορικοί τόποι που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα ήταν πολυμορφικοί, με τον αριθμό των αλληλομόρφων να κυμαίνεται από 4 έως 8 με μέσο όρο 6,1 αλληλόμορφα ανά τόπο (Πίνακας 6), ενώ όλοι οι τόποι εμφάνισαν τιμές PIC > 0,45 με μέση τιμή 0,62, το οποίο δείχνει ότι οι τόποι είναι πληροφοριακοί για την αξιολόγηση της γενετικής ποικιλότητας. Οι περισσότεροι τόποι είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p_{HW} < 0,05$) και εμφανίζουν ικανοποιητικές τιμές Fis. Ο τόπος που αποκλίνει περισσότερο από το ισοζύγιο, έχει υψηλές τιμές Fis και Fnull και μεγάλη διαφορά μεταξύ παρατηρούμενης και αναμενόμενης ετεροζυγωτίας είναι ο Mu26. Αυτό, υποδεικνύει ότι υπάρχει έλλειψη ετεροζυγωτών που προκύπτει από πιθανά προβλήματα στη γενοτύπηση του τόπου καθώς ο τόπος εμφανίζει πολλά μηδενικά αλληλόμορφα ($F_{null}=0,3059$).

Η μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H_o) υπολογίστηκε ξανά για το σύνολο των 56 διαφορετικών ατόμων και εκτιμήθηκε σε 0,5985 ενώ η μέση αναμενόμενη (H_e) ήταν 0,6785 (Πίνακας 6). Και οι δύο τιμές είναι αυξημένες σε σχέση με την προηγούμενη ανάλυση του 2017 ως αποτέλεσμα του αυξημένου αριθμού γενετικών τόπων που περιλήφθηκαν στην ανάλυση. Ομοίως, ο πληθυσμός παρουσιάζει στατιστικά σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg αλλά αν αφαιρεθεί από την ανάλυση ο τόπος G10P και Mu26, ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία.

Πίνακας 6: Αριθμός αλληλομόρφων (A), Μέγεθος αλληλομόρφων σε bp (R), Παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (Ho), Αναμενόμενη ετεροζυγωτία (He), Τιμή πιθανότητας για το τεστ Hardy-Weinberg (pHW), δείκτης ενδογαμίας (Fis), Πιθανότητα μηδενικών αλληλομόρφων (null alleles) (F(null)), πληροφορία που περιέχεται στους πολυμορφισμούς των τόπων (polymorphic information content (PIC)) για τον πληθυσμό της καφέ αρκούδας στην περιοχή του Αμυνταίου.

Τόπος	A	R	Ho	He	pHW	Fis	F(null)	PIC
G10H	8	224- 260	0,5854	0,6682	0,0050	0,1253	0,0942	0,6222
Mu26	5	184- 202	0,3421	0,6523	0,0059	0,4789	0,3059	0,5962
G1D	5	174- 186	0,6500	0,7399	0,6209	0,1228	0,0613	0,688
G10X	4	136- 154	0,4634	0,5191	0,0043	0,1085	0,0407	0,4783
G1A	6	177- 193	0,6607	0,5724	0,2737	-0,1559	-0,0870	0,4732
G10P	8	140- 156	0,5882	0,8350	0,004	0,2976	0,1722	0,8034
G10C	8	96-112	0,7736	0,8164	0,7045	0,0529	0,0255	0,7839
Mu59	7	219- 251	0,4815	0,6154	0,3146	0,2193	0,1089	0,5813
G10L	5	152- 170	0,6852	0,6494	0,9457	-0,0557	-0,0331	0,5874
Mu50	5	103- 111	0,7547	0,7175	0,6757	-0,0524	-0,0330	0,6559
Πληθυσμός	6,1		0,5985	0,6785	High. sign.	0,0859		0,6270

4. Συζήτηση

Αξιοπιστία των δεδομένων που προέρχονται από μη επεμβατική γενετική δειγματοληψία (NGS)

Η μη επεμβατική δειγματοληψία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα για την συλλογή γενετικού υλικού κρυπτικών και σπάνιων ειδών. Η χρήση άλλων μεθόδων, όπως η απευθείας δειγματοληψία από το ζώο, μπορεί να είναι επικίνδυνη, χρονοβόρα, με μεγαλύτερο οικονομικό κόστος και το βασικότερο μπορεί να τραυματίσει και να ταράξει το ζώο.

Στην παρούσα έρευνα έγινε χρήση της μη επεμβατικής γενετικής δειγματοληψίας με σκοπό να συλλεχθούν δείγματα καφέ αρκούδας στην περιοχή του Αμύνταιου, χωρίς να είναι απαραίτητος ο χειρισμός τους. Συνολικά, συλλέχθηκαν 255 δείγματα τριχών. Στη γενετική, η ποιότητα των τριχών παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιτυχή απομόνωση DNA και στην περαιτέρω ενίσχυση των μικροδορυφορικών τόπων. Από τα 255 δείγματα, τα 25 δεν είχαν καθόλου ρίζες ενώ μόνο τα 155 είχαν περισσότερες από 4 ρίζες (58%) από τα όποια ήταν εφικτή η επιτυχής απομόνωση DNA στα 110 δείγματα (48%). Η επιτυχία της απομόνωσης του DNA ελέγχθηκε με PCR και το δείγμα θεωρήθηκε ότι απομονώθηκε επιτυχώς όταν υπήρχε ενίσχυση σε τουλάχιστον έναν μικροδορυφορικό τόπο. Το πρόβλημα που προκύπτει από τα δείγματα της μη επεμβατικής δειγματοληψίας είναι το υλικό (τρίχες, περιττώματα κ.α.) που δεν φέρει μεγάλη ποσότητα γενετικού υλικού και μπορεί να έχει αλλοιωθεί και επιμολυνθεί από το περιβάλλον που βρίσκεται. Η χαμηλή ποσότητα, ο κατακερματισμός και η επιμόλυνση του γενετικού υλικού από το περιβάλλον με πιθανούς αναστολείς της αντίδρασης της PCR δυσχεραίνουν την επιτυχή ενίσχυση των γενετικών δεικτών. Το ποσοστό των δειγμάτων που γενοτυπήθηκαν επιτυχώς σε παρόμοιες έρευνες ανέρχονται περίπου στο 50% (Pérez *et al*, 2009; Tsaparis *et al*, 2014).

Γενετική ποικιλότητα του πληθυσμού

Ο πληθυσμός της καφέ αρκούδας στην περιοχή του Αμύνταιου παρουσιάζει ικανοποιητικά επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας με την μέση παρατηρούμενη **ετεροζυγωτία (Ho) να είναι 0,5985 ενώ η μέση αναμενόμενη (He) ήταν 0,6785**. Αντίθετα, οι τιμές αυτές με τις αναλύσεις που έγιναν στην ίδια περιοχή το 2017, ήταν πολύ χαμηλότερες με την μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (Ho) να είναι 0,412. Η χαμηλή τιμή της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας που βρέθηκε στον πληθυσμό του Αμύνταιου το 2017 σε σχέση με τη παρούσα ανάλυση οφείλεται κυρίως στον χαμηλότερο αριθμό μικροδορυφορικών τόπων (6) που χρησιμοποιήθηκαν το 2017 καθώς και στην αυξημένη πιθανότητα ύπαρξης μηδενικών αλληλομόρφων. Παρόμοιες έρευνες που έγιναν στην περιοχή των Γρεβενών, της Καστοριάς, της Ροδόπης, του Περιστερίου και της ευρύτερης περιοχής της Πίνδου βρήκαν ότι οι πληθυσμοί παρουσιάζουν μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (Ho) με τιμές από 0,58 και 0,65 αντίστοιχα (Πίνακας 7). Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με την παρούσα ανάλυση.

Πίνακας 7. Συγκριτικός πίνακας μεταξύ των πληθυσμών των Γρεβενών, της Καστοριάς, της Ροδόπης και του Αμύνταιου για το μέσο αριθμό των αλληλομόρφων (A), την μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (Ho), το πληθυσμιακό μέγεθος (Nc) και το δραστικό μέγεθος (Ne).

Πληθυσμός	Αριθμός δειγμάτων	A	Ho	Nc	Ne	Βιβλιογραφία
Γρεβενά	131	5,6	0,65	51	29	Karamanlidis <i>et al</i> , 2011
Καστοριά	140	5,8	0,58	219	49	Tsarpas <i>et al</i> , 2014
Ροδόπη	26	5,8	0,63			Αδημοσίευτο
Περιστέρι	30	5,4	0,65	109	59,1	Pilidis <i>et al.</i> , 2018
Πίνδος	97	4,5	0,61	299	97,4	Pilidis <i>et al.</i> , 2018
Αμύνταιο (2017)	75	6,8	0,41	154	44	

Μέγεθος του πληθυσμού (Nc) και δραστικό μέγεθος του πληθυσμού (Ne)

Ένας από τους βασικούς σκοπούς της συγκεκριμένης έρευνας ήταν ο υπολογισμός του πληθυσμιακού μεγέθους της καφέ αρκούδας στην περιοχή του Αμύνταιου με την χρήση μη επεμβατικών μεθόδων γενετικής δειγματοληψίας. Μετά από την γενοτύπηση των δειγμάτων ήταν δυνατή η ταυτοποίηση 56 διαφορετικών ατόμων στην περιοχή της έρευνας. Συνεπώς, ο πληθυσμός στην περιοχή αποτελείται από **τουλάχιστον 56 άτομα**. Ο αριθμός αυτός είναι σε απόλυτη συμφωνία με την εκτίμηση που έγινε στην ίδια περιοχή και το 2017.

Τα περισσότερα ταυτοποιημένα άτομα ήταν αρσενικά, ειδικότερα τα αρσενικά άτομα ήταν 1,5 φορές περισσότερα των θηλυκών, υποδεικνύοντας ότι υπήρξε ετερογένεια στην πιθανότητα σύλληψης τους. Τα αρσενικά άτομα παρουσιάζουν σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό την συμπεριφορά κατά την οποία τρίβονται πάνω σε στύλους της ΔΕΗ για να σημαδέψουν την περιοχή τους. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά οδηγεί σε άνιση δειγματοληψία των τριχών μεταξύ των δυο φύλων (Green και Mattson 2003; Tsarpas *et al.*, 2014). Ο συνδυασμός της χρήσης τριχών μαζί με άλλου τύπου δείγματος, όπως περιττώματα, μπορεί να αποτελέσει μια λύση για να αντιμετωπιστεί η πιθανή υποτίμηση του αριθμού των θηλυκών σε παρόμοιες έρευνες.

Ο υπολογισμός του πληθυσμιακού μεγέθους (Nc) έγινε με το πρόγραμμα CAPWIRE με βάση τα δεδομένα σύλληψης και επανασύλληψης των ατόμων τα οποία συλλέχθηκαν στην διάρκεια μιας δειγματοληψίας. Υπολογίστηκε ότι το πληθυσμιακό **μέγεθος (Nc) είναι 161** άτομα, αριθμός που είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερος από τον ελάχιστο αριθμό ατόμων που ταυτοποιήθηκαν στην έρευνα. Επίσης, ο αριθμός αυτός βρίσκεται σε συμφωνία με την εκτίμηση του πληθυσμού που έγινε στην περιοχή το 2017 (**154 άτομα**). Μία από τις βασικές παραδοχές του προγράμματος CAPWIRE είναι ότι ο υπό μελέτη πληθυσμός είναι κλειστός, δηλαδή δεν υπάρχει καμία μετανάστευση ατόμων, γέννηση ή θάνατος κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας. Αν και κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας δεν υπάρχουν γεννήσεις ατόμων καθώς η καφέ αρκούδα γεννάει τους τελευταίους μήνες του χειμώνα, ο θάνατος των ατόμων από παράνομες δραστηριότητες, όπως κυνήγι και δηλητηρίαση καθώς και θάνατοι από φυσικά αίτια και ατυχήματα δεν μπορούν να αποκλειστούν (Boullanger και McLellan 2001; Miller *et al*, 2005). Επίσης, η πιθανή μετακίνηση ατόμων μεταξύ Ελλάδας και Σκοπίων μπορεί να είναι ακόμη μια παραβίαση της παραδοχής του κλειστού πληθυσμού. Ψευδώς μεγαλύτερη εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους μπορεί να γίνει από το πρόγραμμα

και όταν η έκταση που διαβιώνουν οι οργανισμοί είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την περιοχή της έρευνας (Boulangier και McLellan, 2001). Η μετακίνηση ατόμων μέσα και έξω από την περιοχή της έρευνας μπορεί να επηρεάσει θετικά τον αριθμό των μοναδικών συλλήψεων των ατόμων και αρνητικά αντίστοιχα τον αριθμό των επανασυλλήψεων. Σε τέτοιες περιπτώσεις το πληθυσμιακό μέγεθος που εκτιμάται δεν αφορά μόνο την περιοχή της έρευνας αλλά μία ευρύτερη περιοχή που καλύπτουν τα είδη (Kendall, 1999). Έρευνα που έγινε το 2011 στην περιοχή της Καστοριάς και αφορούσε την ραδιοπαρακολουθήση 6 καφέ αρκούδων με κολάρο, έδειξε ότι τα “σπίτια” των αρσενικών καλύπτουν πολύ μεγάλες εκτάσεις (165-226 km²) σε αντίθεση με τα θηλυκά που καλύπτουν 10-91 km² (Mertzanis και Plioroulos 2011).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, ο αριθμός του πληθυσμιακού μεγέθους από το πρόγραμμα CAPWIRE δεν αφορά μόνο την περιοχή της έρευνας αλλά πιθανόν αναφέρεται περισσότερο σε έναν υπερπληθυσμό, ο οποίος κατοικεί και έβρα από την περιοχή του Αμυνταίου. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην έρευνα που αφορούσε τον πληθυσμό της καφέ αρκούδας στην Καστοριά, όπου και εκεί η εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους από το πρόγραμμα CAPWIRE ήταν περίπου τρεις φορές μεγαλύτερο, από τον ελάχιστο αριθμό των ατόμων που ταυτοποιήθηκαν (Tsararis et al, 2014).

Το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού (Ne) είναι χαμηλότερο από το όριο των 50 ατόμων που θεωρείται ότι είναι επαρκή για την αποφυγή της ενδογαμίας στον πληθυσμό (Frankham et al, 2002). Αυτό σημαίνει ότι ο πληθυσμός χρήζει ιδιαίτερης διαχείρισης, γιατί μπορεί να είναι ευάλωτος μελλοντικά σε φαινόμενα στενωπού που μπορούν να οδηγήσουν τον πληθυσμό σε εξαφάνιση.

Ο υποπληθυσμός του Αμυνταίου ανήκει στον μεγαλύτερο πληθυσμό της οροσειράς της Πίνδου, όπου υπάρχει πιθανή μετακίνηση ατόμων και γονιδιακή ροή από τους πληθυσμούς της Καστοριάς και των Γρεβενών που παρουσιάζουν υψηλή γενετική ποικιλότητα (Tsararis et al, 2014 ; Karamanlidis et al, 2011), αυτό μπορεί να έχει μια θετική επίδραση στην γενετική σύσταση του πληθυσμού. Επίσης, η γενετική σύσταση του πληθυσμού μπορεί να ενισχυθεί ακόμη περισσότερο με πιθανές μετακινήσεις ατόμων από τους πληθυσμούς της νότιας Αλβανίας και της Βόρειας Μακεδονίας.

5. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, ο πληθυσμός της καφέ αρκούδας στην περιοχή του Αμυνταίου παρουσιάζει ικανοποιητικά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας, σε συμφωνία με αυτή που έχει αναφερθεί για άλλους ελληνικούς πληθυσμούς (Tsaparis *et al*, 2014; Karamanlidis *et al*, 2011, Pilidis *et al*, 2018) και μάλιστα υψηλότερη από αυτή μερικών άλλων πληθυσμών της Ευρώπης (Lorenzini *et al*, 2004; Pérez *et al*, 2009). Αν και η εκτίμηση της γενετικής κατάστασης του πληθυσμού το 2017 έδωσε χαμηλότερες τιμές, φαίνεται ότι η αύξηση των μικροδορυφορικών τόπων στην παρούσα μελέτη έδωσε καλύτερη εικόνα της κατάστασης του πληθυσμού και φάνηκε να παρουσιάζει ικανοποιητικά επίπεδα ετεροζυγωτίας.

Υπολογίστηκε ότι το πληθυσμιακό μέγεθος (N_c) είναι **161 άτομα**, αριθμός που είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερος από τον ελάχιστο αριθμό ατόμων που ταυτοποιήθηκαν στην έρευνα (**56 άτομα**). Όπως όμως προαναφέρθηκε, το συγκεκριμένο αποτέλεσμα θα πρέπει να αντιμετωπιστεί μάλλον με επιφυλακτικότητα ως προς την αξιοπιστία του. Οι δημιουργοί του προγράμματος υποστηρίζουν ότι ακριβείς εκτιμήσεις προκύπτουν με τιμές σύλληψης/άτομο της τάξης του 2 ή περισσότερο (βλ. Miller *et al*. 2005). Στην παρούσα μελέτη 44 άτομα συνελήφθησαν μόλις μία φορά, ενώ τα υπόλοιπα 12 άτομα συνελήφθησαν από 2-5 φορές και ο δείκτης μέσης σύλληψης/άτομο ήταν 1,5. Χαμηλός είναι ο δείκτης σύλληψης και για τη μελέτη του 2017 (1,2). **Ωστόσο, και οι δύο μελέτες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές συμφωνούν σε μια πιθανή πυκνότητα πληθυσμού από 154-161 άτομα.** Μια εντατικότερη δειγματοληψία (αύξηση του αριθμού των δειγμάτων) ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των επανασυλλήψεων τουλάχιστον κατά 50% θα μπορούσε μελλοντικά να επιβεβαιώσει το ακριβές μέγεθος του πληθυσμού μιας και οι σημειακές εκτιμήσεις του πληθυσμιακού μεγέθους αποτελούν ουσιαστικά μια στιγμιαία απεικόνιση του πληθυσμού (snapshot). Συστηματικά και σε βάθος χρόνου προγράμματα παρακολούθησης (monitoring) μπορούν με ασφάλεια να δώσουν απαντήσεις σε θέματα όπως η διακύμανση της πληθυσμιακής πυκνότητας, η επιλογή βιοτόπου, το εύρος και η κατανομή των περιοχών επικράτειας ή η χωρική συμπεριφορά. Η μεθοδολογία γενετικής ταυτοποίησης δειγμάτων που συλλέγονται με μη παρεμβατική δειγματοληψία αποτελεί μια αρκετά αξιόπιστη και αποδοτική προσέγγιση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τέτοια προγράμματα στην περιοχή του Αμύνταιου προκειμένου να μελετηθεί ο πληθυσμός της αρκούδας.

Βιβλιογραφία

Bellemain, E and Taberlet, P (2004) Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Molecular Ecology Notes*, 4: 519-522.

Bellemain E, Swenson JE, Tallmon D, Brunberg S and Taberlet P (2005) Estimating population size of elusive animals using DNA from hunter-collected feces: comparing four methods for brown bears. *Conservation Biology* 19: 150-161.

Boulanger, John, and Bruce McLellan. "Closure violation in DNA-based mark-recapture estimation of grizzly bear populations." *Canadian Journal of Zoology* 79.4 (2001): 642-651.

De Barba M, Waits LP, Garton EO, Genovesi P, Randi E, Mustoni A and Groff C (2010) The power of genetic monitoring for studying demography, ecology and genetics of a reintroduced brown bear population. *Molecular Ecology* 19: 3938-3951.

Frankham, Richard, David A. Briscoe, and Jonathan D. Ballou. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press, 2002.

Gervasi V, Ciucci P, Boulanger J, Posillico M, Sulli C, Focardi S, Randi E and Boitani L (2008) A preliminary estimate of the Apennine brown bear population size based on hair-snag sampling and multiple data source mark-recapture Huggings models. *Ursus* 19:105-121.

Green, Gerald I., and David J. Mattson. "Tree rubbing by Yellowstone grizzly bears *Ursus arctos*." *Wildlife Biology* 9.1 (2003): 1-10.

Karamanlidis, A. "First Genetic Census of brown bear (*Ursus arctos*) population in Greece." *Final Report* (2011): 1-87.

Karamanlidis, Alexandros A., *et al.* "Genetic diversity, structure, and size of an endangered brown bear population threatened by highway construction in the Pindos Mountains, Greece." *European journal of wildlife research* 58.3 (2012): 511-522.

Karamanlidis, Alexandros A., *et al.* "Noninvasive genetic studies of brown bears using Kohn MH, York EC, Kamradt DA, Haught G, Sauvajot RM and Wayne RK (1999)

Estimating population size by genotyping feces. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 266: 657-663.

Kendall, William L. "Robustness of closed capture-recapture methods to violations of the closure assumption." *Ecology* 80.8 (1999): 2517-2525.

Kohn MH & Wayne RK (1997) Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 223-227.

Lorenzini, Rita, *et al.* "Non-invasive genotyping of the endangered Apennine brown bear: a case study not to let one's hair down." *Animal Conservation forum*. Vol. 7. No. 2. Cambridge University Press, 2004.

Luikart G, Ryman N, Tallmon DA, Schwartz MK and Allendorf FW (2010) Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conservation Genetics* 11:355-373.

Mckelvey K and Schwartz MK (2005) DROPOUT: a program to identify problem loci and samples for noninvasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. *Molecular Ecology Notes*, 5:716-718.

Mertzanis, G., and G. Iliopoulos. *Identification and effective delineation of sectors over the main road and highway network with high risk of bear (Ursus arctos) traffic accidents for minimization of bear related mortality. Callisto NGO, Thessaloniki. Project LIFE09NAT/GR/00333, 2011.*

Miller CR, Joyce P & Waits LP (2005) A new method for estimating the size of small populations from genetic mark-recapture data. *Molecular Ecology* 14:1991–2005.

Pagès M, Maudet C, Bellemain E, Taberlet P, Hughes S and Hänni C (2009). A system for sex determination from degraded DNA: a useful tool for palaeogenetics and conservation genetics of ursids. *Conservation Genetics* 10: 897–907.

Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347–354.

Paetkau, D., Shields, G. F. & Strobeck, C. (1998). Gene flow between insular, coastal and interior populations of brown bears in Alaska. *Molecular Ecology* 7: 1283-1292.

Peel, D., J. R. Oviden, and S. L. Peel. "NeEstimator: Software for Estimating Effective Population Size, Version 1.3. Department of Primary Industries and Fisheries, Queensland Government." *City East, Queensland, Australia* (2004).

Pérez T, Vazquez F, Naves J, Fernandez A, Corao A, Albornoz J and Dominguez A (2009) Non-invasive genetic study of the endangered Cantabrian brown bear (*Ursus arctos*). *Conservation Genetics* 10:291–301.

Pilidis, C., Anijalg P., *et al.* "The genetics of the brown bears (*Ursus arctos*) in Greece display signature patterns of rear-edge populations". 2018 (Submitted).

Raymond M & Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.

Taberlet P, Camarra J-J, Griffin S, Uhres E, Hanotte O, Waits LP, Dubois-Paganon C, Burke T, Bouvet J (1997) Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6:869–876.

Tsaparis, D., Karaiskou, N., Mertzanis, Y., and Triantafyllidis, A. (2014). Non invasive genetic study and population monitoring of brown bear (*Ursus arctos*) in Kastoria region – Greece. *Journal of Natural History* (in press).

Waits LP & Paetkau D (2005) Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, 69: 1419–1433.