

بررسی تنوع ژنتیکی جمیعت‌های گرگ ایرانی و سگ‌های اهلی و ولگرد با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

Evaluation of genetic variability in Iranian wolf (*Canis lupus pallipes*) and free-ranging dog (*C. familiaris*) populations using microsatellite markers

رسول خسروی^{۱*}، محمد کابلی^۲، حمیدرضا رضابی^۳، شهاب الدین منتظری^۴

- ۱- دانشجوی دکتری گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان.
- ۲- دانشیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
- ۳- استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گرگان.
- ۴- استادیار سازمان حفاظت محیط زیست

Khosravi R^{*1}, Kaboli M², Rezaei HR³, Montazami SH⁴

1. PhD Student, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Esfahan, Iran.
2. Associate Professor, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Assistant Professor, Faculty of Natural Resources, University of Gorgan, Gorgan, Iran.
4. Assistant Professor, Iranian Department of Environment, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: khosravi65@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۳)

چکیده

در این مطالعه از جمیعت‌های گرگ و سگ کشور در سال ۱۳۹۰-۱۳۸۰ نمونه‌برداری صورت گرفت و ۲۸ نمونه گرگ و ۲۸ نمونه سگ با استفاده از ۱۵ نشانگر ریزماهواره تعیین ژنتیک شده و تنوع ژنتیکی جمیعت‌ها بررسی شد. میانگین هتروژنیتی مورد انتظار و غنای آللی در جمیعت‌های گرگ به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۸۰ و ۱۱/۵۶ و ۱۱/۵۶ نمونه‌های سگ و ۰/۸۳ و ۰/۹۳۵ بروآورد شد. بالا بودن پارامترهای تنوع ژنتیکی همچون غنای آللی، هتروژنیتی موردنظر و هتروژنیتی مشاهده شده نشان از تنوع ژنتیکی بالا در جمیعت‌های گرگ کشور در مقایسه با سایر کشورها بود که این تنوع می‌تواند ناشی مهاجرت و تنوع زیستگاهی بالا در کشور باشد. تعداد آلل‌های مشاهده شده برای نمونه‌های گرگ و سگ به ترتیب ۱۵۹ و ۱۴۱ آلل و ضربی درون آمیزی (همخونی) برای نمونه‌های گرگ و سگ به ترتیب ۰/۱۴۸ و ۰/۱۲۲ برآورد شد. همچنین ۳۵ آلل اختصاصی در گرگ‌ها و ۱۸ آلل در نمونه‌های سگ تعیین شد. شاخص‌های تمایز جمیعتی F_{ST} و Fit به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۳۶ و ۰/۰۸۴ و ۰/۰۸۴ تخمین زده شد که واگرایی ژنتیکی دو گونه گرگ و سگ را نشان داد. ترسیم درخت فیلوزنی بین نمونه‌های سگ و گرگ با استفاده از شاخص فاصله ژنتیکی ADS نشان داد که نمونه‌های گرگ و سگ دو گروه مجزا را تشکیل می‌دهند. علیرغم ناکافی بودن نمونه‌ها از سراسر پراکنش گرگ در ایران، نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که تنوع ژنتیکی گرگ‌ها در کشور هنوز در سطح قابل قبولی قرار دارد. همچنین با وجود کاهش زیستگاه‌های طبیعی گرگ‌ها در کشور و همچواری آنها با سگ‌های اهلی و ولگرد در حاشیه روستاهای جریان ژنی اندکی بین این گونه با سگ‌های اهلی برقرار بوده و همچنان ساختار ژنتیکی مجازابی را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
درون آمیزی،
ریزماهواره،
گرگ ایرانی،
هتروژنیتی

مقدمه

آگاهی از تنوع و ساختار ژنتیکی جمیعت‌ها نقش مهمی در حفاظت و مدیریت گونه‌ها داشته و می‌تواند به عنوان ابزاری جهت بررسی اثر عوامل تخریب زیستگاه بر روی گونه‌ها عمل نماید. حفظ، نگهداری و افزایش تنوع ژنتیکی گونه‌ها عوامل مهم در مدیریت و تضمین بقا طولانی مدت جمیعت‌ها است (Hall and Bardley 1995; Zhang et al. 2009 همچون انتخاب طبیعی، رانش ژنتیکی، مهاجرت، انتشار، سیستم‌های جفتگیری (McRae et al. 2005)، تخریب و تکه تکه شدگی زیستگاه (Keller and Largiader 2002; Riley et al. 2006)، قرار گرفتن جمیعت‌ها در گردنه بطری و کاهش جمیعت‌های طعمه اهمیت بسزایی در تعیین تنوع ژنتیکی جمیعت‌های وحشی دارد.

ریزماهواره‌ها نشانگرهای چندریختی^۱ بوده که از هر دو والد به فرزندان متقل می‌شوند. این نشانگرها کاربرد وسیعی در بررسی تنوع ژنتیکی، ساختار جمیعت‌ها، تفاوت‌های ژنتیکی بین جمیعت‌ها و محاسبه جریان ژنی بین گونه‌های حیات وحش دارند (Kohn et al. 1999; Balloux and Lugon-Moulin 2002). مطالعات ژنتیکی اخیر نشان داده که دو گونه سگ و گرگ ساختار ژنتیکی نزدیکی به هم داشته که سبب شده این دو گونه در طبیعت و اسارت^۲ با یکدیگر جفتگیری کنند (Vila and Wayne 1999; Randi et al. 2000). بسیاری از متخصصان بیان می‌کنند که جفتگیری طبیعی این دو گونه بسیار نادر بوده و تهدید چندانی را در رابطه با جمیعت‌های گرگ بوجود نمی‌آورد. نتایج استفاده از نشانگرهای مختلف نشان می‌دهد که برخلاف اختلاط بسیار نادر این دو گونه در طبیعت، جمیعت‌های گرگ و سگ از لحاظ ساختار ژنتیکی مجزا بوده و ژنوتیپ‌های بدست آمده با بررسی نشانگرها مختلف توانایی تفکیک جمیعت‌های این دو گونه به (Andersone et al. 2002; Randi and Lucchini 2002; Verardi et al. 2006). گروه‌های مجزا را داشته‌اند (روهای گرگ خاکستری در سال‌های اخیر جمیعت این گونه در بسیاری از زیستگاه‌های

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

اجرای مطالعات ژنتیکی در رابطه با گوشتخواران بزرگ جثه همچون گرگ، همواره با مشکلات و محدودیت‌های زیادی مواجه است که به دلایل متعددی از جمله کمیاب بودن، پنهان کاری و همچنین رفتارهای تهاجمی آنها نسبت داد. لذا در این مطالعه از نمونه‌های بافت ماهیچه از لاشه گرگ‌های تلف شده در اثر تلفات جاده‌ای، گرگ‌های شکار شده توسط ادارات محیط زیست استان‌ها (به واسطه جلوگیری از آسیب رساندن به جوامع روستاپی) و همچنین گرگ‌های شکار شده به طور غیر قانونی توسط روستاپیان و دامداران نقاط مختلف کشور در طی سال‌های

¹ Polymorphism² Captive breeding

جدول ۱- تعداد، شماره و موقعیت جغرافیایی نمونه‌های جمع‌آوری شده گرگ در کشور.

| شماره نمونه | تعداد | منطقه | شماره نمونه | تعداد | منطقه |
|-------------|-------|--------------|--------------------------|-------|----------------|
| W12 | ۱ | بوشهر | W13 | ۱ | آذربایجان غربی |
| W15 | ۱ | شهرکرد | W1-W6, W9, W21, W25, W28 | ۱۰ | همدان |
| W17 | ۱ | هرمزگان | W7, W8, W22 | ۳ | زنجان |
| W26, W27 | ۲ | جنوب | W11, W14, W16 | ۳ | قزوین |
| W23 | ۱ | اراک | W18 | ۱ | تبریز |
| W10 | ۱ | نمونه نامشخص | W24 | ۱ | سمنان |
| W20 | ۱ | خوزستان | W19 | ۱ | اصفهان |

در این مطالعه و همچنین دمای اتصال هر یک از آغازگرهای در جدول ۲ آورده شده است. در این مطالعه سعی شد که از ریزماهواره‌های غیرمتصل به یکدیگر استفاده شود تا فرض مستقل بودن ترکیب آلل‌ها در آزمون‌های مختلف رعایت شود. واکنش PCR زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از کیت‌های مخصوص PCR BIO NEER (AccuPower® PCR PerMix kit) ساخت شرکت BIO NEER (AccuPower® PCR PerMix kit) perkin elmer 9600 انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۲ میکرولیتر صورت گرفت. چرخه PCR در طی ۳۰ چرخه و به ترتیب با ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۵-۵۵ درجه و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام شد. پس از تکثیر توالی‌های مورد نظر، محصول PCR با استفاده از ژل اکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز شد (شکل ۱). رنگ آمیزی با استفاده از روش نیترات نقره انجام شد. عکس برداری با استفاده از دستگاه Gel Doc™ XR و اندازه‌گیری باندها و شماره‌گذاری آلل‌ها با استفاده از نرم افزار Gel- Pro Analazere ۶ صورت گرفت. تمامی فعالیت‌های آزمایشگاهی در آزمایشگاه محیط زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گرگان به انجام رسید. آنالیز تنوع ژنتیکی از آنجا که تعداد آلل‌های مشاهده شده در یک جمعیت همبستگی مثبت با تعداد نمونه دارد، لذا در این مطالعه غنای آللی بر اساس

۱۳۸۹-۱۳۹۰ نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها بیشتر از بافت‌های ماهیچه و کبد برداشت شد. در نهایت تعداد ۲۸ نمونه بافتی گرگ از محدوده پراکنش این گونه در کشور جمع‌آوری شد (جدول ۱). همچنین تعداد ۲۸ نمونه سگ نیز که بیشتر از استان‌های غربی کشور شامل زنجان، همدان و همچنین قزوین بودند، جمع‌آوری شد. البته از برخی دیگر از مناطق کشور نیز تعدادی نمونه سگ تهیه شد. در این مطالعه از روش نمونه‌گیری دو مرحله‌ای استفاده شد. بدین منظور ابتدا نمونه را در لوله آزمایش ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۹ درصد قرار داده و پس از گذشت ۲۴ ساعت الکل تخلیه و داخل لوله ۲۰ گرم سیلیکا ژل ریخته شد. همچنین ۲۸ نمونه بافت از سگ‌های اهلی و وحشی نیز به همین روش و به منظور مقایسه و بررسی میزان تفاوت ژنتیکی با گرگ‌ها از مناطقی که این گونه با گرگ همزیست بود، جمع‌آوری شد.

استخراج DNA و آنالیز ریزماهواره‌ها AccuPrep® DNA با استفاده از کیت‌های استخراج ساخت شرکت BIO NEER کشور کره صورت گرفت. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، از ۱۵ ریزماهواره کروموزوم‌های غیر جنسی که در مطالعات دیگر استفاده شده بودند و نرخ بالایی از چندریختی را نشان می‌دادند، استفاده شد (Andersone et al. 2002; Randi et al. 2002; Jedrzejewski et al. 2005; Verardi et al. 2006; Aspi et al. 2009)

جدول ۲- توالی و دمای اتصال ۱۵ ریزماهواره به منظور تعیین ژنوتیپ نمونه‌های سگ و گرگ (AT: دمای اتصال).

| Name | Reverse Primer (5'-3') | Forward Primer (5'-3') | AT |
|---------|---------------------------|---------------------------|-----|
| CPH2 | TTCTGTTGTTATCGGCACCA | TTCTTGAGAACAGTGTCCCTTCG | 56° |
| CPH3 | CAGGTTCAAATGATGTTTCAG | TTGACTGAAGGAGATGTGGTAA | 55° |
| CPH4 | ACTGGAGATGAAAAGTAAGATTATA | TTACAGGGGAAAGCCTCATT | 55° |
| CPH5 | TCCATAACAAGACCCAAAC | GGAGGTAGGGTCAAAGATT | 55° |
| CPH6 | CATTGGCTGTTGACTCTAGG | ACTGATGTGGGTGTCCTGC | 57° |
| CPH7 | ACACAACTTCCATAATACTTCCA | ATCAATGCTCCTCCCCAG | 58° |
| CPH8 | AGGCTCACAATCCCTCTCAT | TAGATTGATAACCTCCC TGAGTCC | 58° |
| CPH9 | CAGAGACTGCCACTTAAACACAC | AAAGTTCTCAAATACCATTGTTACA | 58° |
| CPH12 | GGCATTACTGGAGGGAGGAA | GATGATTCCATGCTTCTTGAG | 57° |
| CPH16 | CTACACCACTTAGGAACTAGC | CAGATTCAAATCCACTCTCAGAC | 57° |
| CPH22 | TCTTTCATTACATTTGGCTCA | GCCCCAAAATCCGTGT | 55° |
| FH2004 | CTAAGTGGGGAGCCTCCTCT | ACTGTGACCTACTGAGGTTGCA | 57° |
| C20.253 | GCAGTCCTTATTCCAACATG | CCCCAAGTTGCATCTGTT | 57° |
| CXX.213 | AATATGGGAGAGGAGAAGAGGG | ATGCTTCCTGTAAGCAATCA | 56° |
| C09.250 | TTAGTTAACCCAGCTCCCCCA | TCACCCCTGTTAGCTGCTCAA | 58° |

مارکوو⁷ (Guo and Thompson 1992)، (۲) بررسی افزایش و یا کاهش هتروزیگوستی بر اساس هر جایگاه در هر جمعیت^۸ (Rousset and Raymond 1995)، (۳) انحراف از تعادل اتصالی^۹ (صرف‌نظر از آنکه نشانگرهای استفاده شده بر روی کروموزوم‌ها جداگانه قرار داشتند، با این وجود تعادل اتصالی بین تمامی ترکیب‌های جفت جایگاه بررسی شد) و (۴) محاسبه ضربی درون‌آمیزی برای هر جایگاه در هر نمونه با استفاده از روش استفاده شده در نرم‌افزار GENEPOL با ۱۰۰۰ بار شبیه‌سازی، ۲۰۰۰ تکرار صورت گرفت. در تمامی موارد خطای ناشی از انجام آزمون‌های متعدد با کمک شاخص بونفرونی^۹ اصلاح شد (Rice 1989).

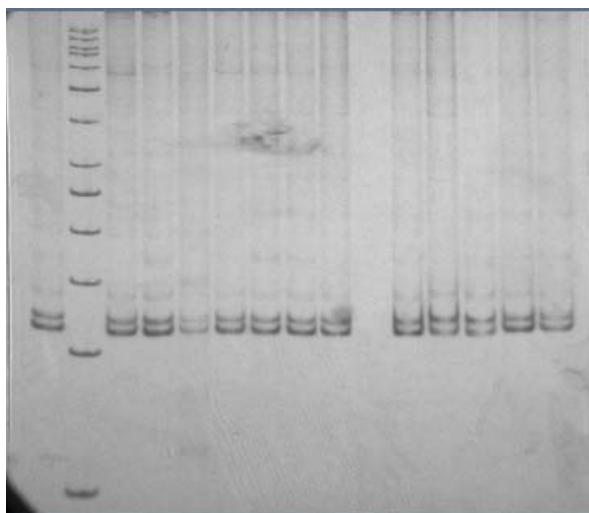
بررسی میزان تفاوت ژنتیکی بین دو گونه سگ و گرگ از نرم‌افزار FSTAT به منظور تخمین میزان تنوع ژنتیکی کل (HT)، میانگین تنوع ژنتیکی درون هر جمعیت (Hs) و تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها (DST= Ht- Hs) استفاده شد. Balloux

هر جایگاه (Rs) و همچنین غنای آللی^۱ کل (Rt) بر اساس روش FSTAT (Mousadik and Petit 1996) و با استفاده از نرم‌افزار Goudet 2001 (H_E). هتروزیگوستی مورد ۲.۹.۳ محاسبه شد (Nei 1987) و مشاهده شده^۴ (H_O) برای هر جایگاه و بر اساس تعداد آلل‌های اختصاصی برای هر یک از دو جمعیت سگ و گرگ به صورت جداگانه و با استفاده از نرم‌افزار GENEPOL 4.0.10^۵ محاسبه شد (Raymond and Rousset 1995). از آزمون t مستقل به منظور بررسی تفاوت معنی‌دار بین هتروزیگوستی مورد انتظار و غنای آللی بین دو جمعیت سگ و گرگ استفاده شد (SPSS Inc 15.0; SPSS Inc 2004). از نرم‌افزار GENEPOL برای محاسبه (۱) تعادل هاردی- واینبرگ^۶ (Weir 1990; Guo and Thompson 1992) بر اساس هر جایگاه در هر جمعیت و همچنین تمامی جایگاه‌ها در هر جمعیت (Fisher's method) با استفاده از الگوریتم زنجیره

¹ Allelic richness² <http://softlinks.amnh.org/microsatellites.html>³ Expected heterozygosity⁴ Observed heterozygosity⁵ <http://genepop.curtin.edu.au>⁶ Hardy-Wienberg equilibrium⁷ Markov chain algorithm⁸ Linkage equilibrium⁹ Benfferoni

نتایج و بحث

استخراج DNA و تکثیر ریزماهواره‌های مورد مطالعه در رابطه با تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد (شکل ۱). تمامی ریزماهواره‌های بررسی شده در این مطالعه چند شکلی بالایی نشان داده و تعداد آلل‌ها بسته به نوع جایگاه متفاوت و بین ۷ آلل (CPH22, FH2004) تا ۱۷ آلل (CPH8) در نمونه‌های گرگ و ۵ آلل (CPH22) تا ۱۴ آلل (CXX.213) در نمونه‌های سگ متغیر بود. غنای آللی (Rs) در نمونه‌های سگ و گرگ شبیه و بین ۶/۹۲ تا ۱۶/۶۹ در نمونه‌های گرگ و ۰/۵۰ تا ۱۳/۹۰ در نمونه‌های سگ متغیر بود. تعداد کل آلل‌های مشاهده شده در نمونه‌های گرگ و سگ به ترتیب ۱۵۹ و ۱۴۱ آلل شمارش شد. همچنین تعداد ۵۳ آلل اختصاصی در ۵۶ نمونه مورد مطالعه برآورد شد که نمونه‌های گرگ ۳۵ (درصد) و نمونه‌های سگ ۱۸ (درصد) آلل را شامل شد. هتروزیگوستی مورد انتظار نسبت به هروزیگوستی مشاهده شده در هر دو جمعیت سگ و گرگ کمتر بود و بین ۰/۷۷ تا ۰/۹۲ در نمونه‌های گرگ و ۰/۷۵ تا ۰/۹۲ در نمونه‌های سگ تخمین زده شد (جدول ۳). نتایج آزمون χ^2 مستقل نشان داد که تفاوت معنی‌داری در رابطه با هetrozygosity مورد انتظار (Sig = ۰/۲۲۳, df = ۲۸, $\alpha = ۰/۰۱$) و غنای آللی (Sig = ۰/۳۵۷, df = ۲۸, $\alpha = ۰/۰۱$) بین دو جمعیت سگ و گرگ در سطح یک درصد وجود ندارد.



شکل ۱- ژل آگریل آمید ۱۴ نمونه گرگ برای لوکوس CPH22

and Goudet (2002) جربان ژنی کمی برقرار باشد، استفاده از شاخص تمایز اسلاتكین (R_{ST}) نسبت به F_{ST} تخمین بهتری از میزان تفاوت ژنتیکی بین دو جمعیت ارائه می‌کند. بنابراین، در این مطالعه آزمون آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA; Excoffier et al. 1992) به منظور بررسی میزان تمایز ژنتیکی بین نمونه‌های سگ و گرگ با استفاده از شاخص تمایز جمعیتی اسلاتكین اجرا شد. در این آزمون واریانس ژنتیکی کل به تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها (sig_a)، تنوع ژنتیکی بین افراد داخل هر جمعیت (sig_b) و تنوع ژنتیکی درون افراد (sig_w) تقسیم شد. معنی داری آماری شاخص اسلاتكین با ۱۰۰۰ بار تصادفی سازی ژنوتیپ‌ها در بین جمعیت‌های سگ و گرگ در سطح ۵ درصد پس از اعمال شاخص تصحیح بونفرونی بررسی شد (Goudet et al. 1996). علاوه بر شاخص‌های تمایز جمعیتی اسلاتكین، شاخص‌های محاسبه تنوع ژنتیکی و تمایز جمعیتی وایر و کوکرهام (F_{IS} و Fit, F_{ST}) برای هر یک از جمعیت‌ها محاسبه شد تا نتایج و میزان همپوشانی این دو روش بررسی و تعیین شود که کدام شاخص تمایز جمعیتی دو گونه را بهتر نشان می‌دهد.

آزمون فیشر به منظور بررسی همگنی توزیع آللی و بررسی میزان تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌های سگ و گرگ با استفاده از نرمافزار GENEPOL (http://genepop.curtin.edu.au) لگاریتم بیشینه (G) و ۱۰۰۰ تکرار در هر بار آنالیز اجرا شد (Raymond and Rousset 1995; Goudet et al. 1996) از شاخص فاصله ژنتیکی (Goldstein et al. 1995; Slatkin 1995) به منظور بررسی میزان فاصله ژنتیکی بین افراد و ترسیم درخت فیلوژنیک بین نمونه‌های سگ و گرگ با استفاده از الگوریتم اتصال همسایگی^۱ استفاده شد. ترسیم درخت فیلوژنیک بین نمونه‌ها با استفاده از نرمافزار^۲ TRYPHON (http://bioinformatics.org/~tryphon/populations) صورت گرفت (Langella 2002).

¹ Neighbor joining

² http://bioinformatics.org/project/group

جدول ۳- نتایج محاسبه غنای آللی در هر جایگاه (Rt)، کل نمونه‌ها (Rs)، هتروزیگوستی مورد انتظار (HE) و تعداد آلل‌های اختصاصی (PA) در نمونه‌های سگ و گرگ.

| جایگاه | گرگ | | | سگ | | | Rt |
|------------|-------|------|----|-------|------|----|-------|
| | Rs | He | PA | Rs | He | PA | |
| CPH2 | ۷/۹۹ | ۰/۸۲ | ۱ | ۷/۸۵ | ۰/۷۸ | ۱ | ۸/۲۶ |
| CPH3 | ۱۰/۸۸ | ۰/۸۵ | ۲ | ۱۰/۸۴ | ۰/۸۵ | ۲ | ۱۱/۴۱ |
| CPH4 | ۱۱/۹۲ | ۰/۸۸ | ۵ | ۷/۹۹ | ۰/۸۲ | ۰ | ۱۱/۴۴ |
| CPH5 | ۸/۸۸ | ۰/۸۱ | ۲ | ۶/۹۹ | ۰/۸۲ | ۰ | ۸/۴۲ |
| CPH6 | ۱۱/۰۰ | ۰/۸۸ | ۲ | ۹/۸۵ | ۰/۸۵ | ۰ | ۱۰/۷۷ |
| CPH7 | ۱۱/۷۸ | ۰/۸۹ | ۱ | ۱۲/۷۶ | ۰/۸۹ | ۱ | ۱۲/۹۳ |
| CPH8 | ۱۶/۶۹ | ۰/۹۲ | ۵ | ۱۱/۷۸ | ۰/۸۹ | ۰ | ۱۴/۶۹ |
| CPH9 | ۱۱/۸۴ | ۰/۸۵ | ۰ | ۱۰/۸۵ | ۰/۸۹ | ۱ | ۱۱/۵۵ |
| CPH12 | ۹/۹۲ | ۰/۸۵ | ۲ | ۱۲/۷۰ | ۰/۸۵ | ۵ | ۱۲/۸۲ |
| CPH16 | ۱۲/۸۴ | ۰/۸۹ | ۲ | ۶/۰۰ | ۰/۷۵ | ۰ | ۱۱/۸۰ |
| CPH22 | ۶/۹۲ | ۰/۸۲ | ۲ | ۵/۰۰ | ۰/۷۵ | ۰ | ۶/۴۴ |
| FH2004 | ۶/۹۶ | ۰/۷۷ | ۷ | ۷/۹۲ | ۰/۸۲ | ۵ | ۱۳/۲۶ |
| C20.253 | ۱۲/۸۱ | ۰/۸۵ | ۱ | ۱۳/۹۰ | ۰/۹۲ | ۲ | ۱۴/۰۷ |
| CXX.213 | ۸/۹۶ | ۰/۸۵ | ۲ | ۸/۹۲ | ۰/۸۲ | ۰ | ۱۰/۰۹ |
| C09.250 | ۹/۰۰ | ۰/۸۲ | ۱ | ۷/۰۰ | ۰/۸۲ | ۱ | ۸/۴۴ |
| Total loci | ۱۱/۵۶ | ۰/۸۵ | ۳۵ | ۹/۳۵ | ۰/۸۳ | ۱۸ | ۱۱/۰۹ |

نتایج بررسی کاهش هتروزیگوستی در بین نمونه‌های سگ و گرگ، عدم کاهش هتروزیگوستی را نشان داد و هر دو جمعیت سگ و گرگ افزایش هتروزیگوستی را نشان دادند (تعادل اتصالی بین تمامی ۱۰۵ ترکیب جفت جایگاه اجرا شد ($P < 0.0004$). نتایج بررسی تعادل اتصالی بین ۱۰۵ ترکیب جفت جایگاه نشان داد که فقط در یک جفت جایگاه (CPH4–CPH5) در نمونه‌های سگ و دو جفت جایگاه (CPH5 – FH2004) در نمونه‌های سگ و گرگ عدم تعادل اتصالی در سطح ۵ درصد (پس از اعمال شاخص تصحیح بونفرونی $P < 0.0004$) بروز نموده است و ۱۰۲ ترکیب جفت جایگاه باقی مانده، تعادل اتصالی را نشان دادند. نتایج بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در بین نشانگرهای مورد مطالعه نشان داد که در نمونه‌های گرگ و سگ عدم تعادل هاردی- واینبرگ وجود داشت Fisher's method, $\chi^2 = 50.5$; df = 30; $P = \text{highly sig.}$) significant; ناشی از افزایش هتروزیگوستی، مهاجرت درون هر یک از جمعیت‌های گرگ و سگ، اثر والوند (Wahlund's effect) و بالا بودن نرخ آمیزی نشان دهنده افزایش هتروزیگوستی نسبت به هتروزیگوستی مورد انتظار تحت تعادل هاردی- واینبرگ می‌باشد (جدول ۴).

به منظور بررسی میزان تفاوت ژنتیکی بین نمونه‌های سگ و گرگ از شاخص‌های تمایز (F-statistics) نی و وایر

همانطور که اشاره شد، نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه بر روی کروموزوم‌های مختلفی قرار داشتند. با این وجود بررسی تعادل اتصالی بین تمامی ۱۰۵ ترکیب جفت جایگاه اجرا شد ($P < 0.0004$). نتایج بررسی تعادل اتصالی بین ۱۰۵ ترکیب جفت جایگاه نشان داد که فقط در یک جفت جایگاه (CPH4–CPH5) در نمونه‌های سگ و دو جفت جایگاه (CPH5 – FH2004) در نمونه‌های سگ و گرگ عدم تعادل اتصالی در سطح ۵ درصد (پس از اعمال شاخص تصحیح بونفرونی $P < 0.0004$) بروز نموده است و ۱۰۲ ترکیب جفت جایگاه باقی مانده، تعادل اتصالی را نشان دادند. نتایج بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در بین نشانگرهای مورد مطالعه نشان داد که در نمونه‌های گرگ و سگ عدم تعادل هاردی- واینبرگ وجود داشت Fisher's method, $\chi^2 = 50.5$; df = 30; $P = \text{highly sig.}$) significant; ناشی از افزایش هتروزیگوستی، مهاجرت درون هر یک از جمعیت‌های گرگ و سگ، اثر والوند (Wahlund's effect) و بالا بودن نرخ آمیزی نشان دهنده افزایش هتروزیگوستی نسبت به هتروزیگوستی مورد انتظار تحت تعادل هاردی- واینبرگ می‌باشد (Aminafshar et al. 2008).

جدول ۴- نتایج بررسی انحراف از تعادل هاردی-وانینبرگ و ضریب درون آمیزی برای هر جایگاه در هر جمعیت.

| Locus | گرگ | | | | سگ | | | |
|------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|
| | HWE (exact test) | H deficit (P-val) | H excess (P-val) | F _{IS} (W-C) | HWE (exact test) | H deficit (P-val) | H excess (P-val) | F _{IS} (W-C) |
| CPH2 | 0/003 | 1/000 | 0/000 | -0/210 | 0/003 | 1/000 | 0/000 | -0/278 |
| CPH3 | 0/010 | 1/000 | 0/001 | -0/176 | 0/006 | 1/000 | 0/002 | -0/174 |
| CPH4 | 0/056 | 1/000 | 0/002 | -0/106 | 0/005 | 1/000 | 0/001 | -0/170 |
| CPH5 | 0/011 | 1/000 | 0/001 | -0/106 | 0/004 | 1/000 | 0/001 | -0/210 |
| CPH6 | 0/036 | 1/000 | 0/001 | -0/126 | 0/016 | 1/000 | 0/002 | -0/156 |
| CPH7 | 0/043 | 1/000 | 0/000 | -0/114 | 0/021 | 1/000 | 0/000 | -0/122 |
| CPH8 | 0/153 | 1/000 | 0/002 | -0/072 | 0/041 | 1/000 | 0/001 | -0/102 |
| CPH9 | 0/024 | 1/000 | 0/001 | -0/134 | 0/045 | 1/000 | 0/001 | -0/116 |
| CPH12 | 0/025 | 1/000 | 0/002 | -0/148 | 0/034 | 1/000 | 0/001 | -0/125 |
| CPH16 | 0/069 | 1/000 | 0/002 | -0/103 | 0/000 | 1/000 | 0/003 | -0/340 |
| CPH22 | 0/004 | 1/000 | 0/001 | -0/213 | 0/000 | 1/000 | 0/004 | -0/320 |
| FH2004 | 0/002 | 1/000 | 0/003 | -0/239 | 0/000 | 0/000 | 0/004 | -0/667 |
| C20.253 | 0/024 | 1/000 | 0/003 | -0/133 | 0/137 | 1/000 | 0/005 | -0/076 |
| CXX.213 | 0/018 | 1/000 | 0/007 | -0/166 | 0/010 | 1/000 | 0/006 | -0/177 |
| C09.250 | 0/090 | 0/977 | 0/006 | -0/105 | 0/004 | 1/000 | 0/006 | -0/183 |
| Total loci | | | | -0/148 | | | | -0/122 |

سگ و گرگ بود ($P<0.003$). میزان شاخص F_{ST} بین ۰/۰۰۳ (CPH9) تا ۰/۱۸۱ (FH2004) متغیر بود. از آنجا که میزان شاخص F_{ST} بستگی به میزان هتروزیگوستی جمعیت دارد، لذا بالا بودن میزان هتروزیگوستی درون هر یک از جمعیت‌ها می‌تواند ناشی از تخمین این شاخص کمتر از میزان واقعی باشد (Hedrick 2005). بنابراین کم بودن شاخص F_{ST} در این مطالعه می‌تواند به دلیل بالا بودن نرخ هتروزیگوستی در هر یک از جمعیت‌های سگ و گرگ باشد (Hedrick 2005). نتایج بررسی تفاوت توزیع ژنتیکی و آللی بین نمونه‌های سگ و گرگ نیز تمایز ژنتیکی بین این دو جمعیت را تائید کرد. نتایج آزمون فیشر نیز معنی داری بالای توزیع ژنتیکی و آللی را نشان داد (Fisher's method, $\chi^2=\text{infinity}$, $df=30$, $P=0.0000$) و اگرایی ژنتیکی دو گونه سگ و گرگ در این مطالعه از طریق شاخص تمایز جمعیتی اسلاتكین (R_{ST}) بررسی شد که نسبت به شاخص وایر و کوکرهام در بررسی اگرایی ژنتیکی بین گونه‌ها یا جمعیت‌هایی که جریان ژنی کمی بین آنها برقرار باشد، ارجحیت بیشتری دارد (Balloux and Goudet 2002). در جدول ۵ نتایج محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی بین در جمعیت‌های گرگ و

و کوکرهام استفاده شد. نتایج بررسی شاخص‌های تمایز جمعیتی نشان داد که ۱۵ ریزماهواره استفاده شده در این مطالعه توانایی لازم را به منظور تفکیک نمونه‌های گرگ و سگ داشته‌اند. میانگین شاخص‌های F_{ST} , F_{IS} و F_{IT} به ترتیب ۰/۰۵, ۰/۰۵ و ۰/۰۸۴ محاسبه شد (جدول ۵). تمامی جایگاه‌های مطالعه شده در این مطالعه مقدار منفی برای F_{IS} نشان دادند که این امر نشان دهنده افزایش هتروزیگوستی و نرخ درون آمیزی بسیار کم در نمونه‌های سگ و گرگ بود. معنی داری آماری دو شاخص Fst و Rst نشان دهنده واگرایی ژنتیکی بین دو گونه سگ و گرگ از لحظه توزیع فراوانی آلل و اندازه آلل‌ها و همچنین کم بودن جریان ژنی بین این دو گونه می‌باشد (۰/۰۰۳ < $Rst=0/05$; $Fst=0/05$; $P=0/2595$) شاخص اسلاتكین در این مطالعه (۰/۰۰۳ < P) معنی داری آماری این شاخص نشان دهنده واگرایی ژنتیکی بین دو گونه سگ و گرگ از لحظه توزیع اندازه آلل‌ها و همچنین کم بودن جریان ژنی بین این دو گونه می‌باشد. اگرچه نرخ شاخص تمایز جمعیتی F_{ST} در بین دو جمعیت سگ و گرگ کم بود (۰/۰۵) اما معنی دار بودن این شاخص از نظر آماری نشان از واگرایی ژنتیکی در بین نمونه‌های

جدول ۵- نتایج محاسبه شاخص‌های تمایز جمعیتی نی و وایر و کوکرهام برای نمونه‌های سگ و گرگ. میزان شاخص RST برای تمامی جایگاه‌ها بر اساس روش وزنی محاسبه شد. Roussel (۱۹۹۶)

| Locus | Hs | Ht | Dst | Fit | Fst | Fis | Rst | Siga | Sigb | sigw |
|-----------------------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|------|
| CPH2 | ۰/۸۰۴ | ۰/۸۰۹ | ۰/۰۰۵ | -۰/۲۲۸ | ۰/۰۱۲ | -۰/۲۴۳ | -۰/۰۰۸ | ۰/۰ | ۰/۸ | ۲/۰ |
| CPH3 | ۰/۸۵۰ | ۰/۸۸۹ | ۰/۰۳۸ | -۰/۰۷۹ | ۰/۰۸۲ | -۰/۱۷۶ | ۰/۱۸۴ | ۱/۴ | ۱/۲ | ۴/۹ |
| CPH4 | ۰/۸۶۵ | ۰/۸۸۳ | ۰/۰۱۸ | -۰/۱۱۲ | ۰/۰۳۹ | -۰/۱۵۷ | ۰/۱۳۴ | ۱/۰ | ۰/۵ | ۶/۲ |
| CPH5 | ۰/۸۴۱ | ۰/۸۶۴ | ۰/۰۲۳ | -۰/۱۲۷ | ۰/۰۵۲ | -۰/۱۸۹ | ۰/۱۹۸ | ۰/۸ | -۱/۳ | ۴/۶ |
| CPH6 | ۰/۸۷۵ | ۰/۸۸۱ | ۰/۰۰۵ | -۰/۱۲۹ | ۰/۰۱۲ | -۰/۱۴۳ | ۰/۱۱۹ | ۰/۷ | -۰/۹ | ۶/۳ |
| CPH7 | ۰/۸۸۴ | ۰/۹۱۴ | ۰/۰۳۱ | -۰/۰۵۸ | ۰/۰۶۵ | -۰/۱۳۲ | -۰/۰۰۸ | -۰/۱ | -۵/۲ | ۱۸/۶ |
| CPH8 | ۰/۹۱۶ | ۰/۹۲۵ | ۰/۰۰۹ | -۰/۰۷۰ | ۰/۰۱۹ | -۰/۰۹۱ | ۰/۱۱۰ | ۱/۷ | -۶/۲ | ۱۹/۸ |
| CPH9 | ۰/۸۸۷ | ۰/۸۸۸ | ۰/۰۰۱ | -۰/۱۲۴ | ۰/۰۰۳ | -۰/۱۲۸ | -۰/۰۰۸ | -۰/۱ | -۴/۴ | ۱۳/۰ |
| CPH12 | ۰/۸۷۸ | ۰/۹۰۲ | ۰/۰۲۴ | -۰/۰۷۹ | ۰/۰۵۲ | -۰/۱۳۹ | -۰/۰۷۱ | ۴/۱ | ۱/۲ | ۵/۷ |
| CPH16 | ۰/۸۲۶ | ۰/۸۷۷ | ۰/۰۵۰ | -۰/۰۷۹ | ۰/۱۰۹ | -۰/۲۱۱ | ۰/۱۲۱ | ۱/۵ | -۷/۵ | ۱۸/۴ |
| CPH22 | ۰/۷۹۱ | ۰/۷۹۷ | ۰/۰۰۵ | -۰/۲۴۶ | ۰/۰۱۵ | -۰/۲۶۵ | ۰/۰۲۵ | ۰/۰ | -۰/۳ | ۲/۰ |
| FH2004 | ۰/۸۱۹ | ۰/۹۰۹ | ۰/۰۹۱ | -۰/۳۲۷ | ۰/۱۸۱ | -۰/۱۷۹ | ۰/۹۳۸ | ۴۲/۸ | ۰/۵ | ۲/۳ |
| C20.253 | ۰/۹۰۳ | ۰/۹۱۳ | ۰/۰۰۹ | -۰/۰۸۴ | ۰/۰۲۰ | -۰/۱۰۷ | ۰/۰۹۳ | ۱/۲ | ۳/۹ | ۷/۵ |
| CXX.213 | ۰/۸۵۳ | ۰/۸۶۳ | ۰/۰۰۹ | -۰/۱۴۶ | ۰/۰۲۲ | -۰/۱۷۲ | ۰/۲۷۴ | ۲/۴ | -۱/۷ | ۷/۹ |
| C09.250 | ۰/۸۵۴ | ۰/۸۶۹ | ۰/۰۱۵ | -۰/۱۱۱ | ۰/۰۳۴ | -۰/۱۵۰ | ۰/۱۹۷ | ۰/۹ | -۱/۴ | ۵/۰ |
| Total | ۰/۸۵۶ | ۰/۸۷۹ | ۰/۰۲۲ | -۰/۰۸۴ | ۰/۰۵۰ | -۰/۱۴۱ | ۰/۳۵۹ | ۲/۸۸ | -۱/۴ | ۸/۲۸ |
| Jackknife (mean ± se) | | | | -۰/۰۸۴ | ۰/۰۵۰ | -۰/۱۴۱ | ±۰/۰۳۵ | ±۰/۰۱۳ | ±۰/۰۲۵ | |

محاسبه شد که نسبت به تنوع ژنتیکی محاسبه شده در این مطالعه کمتر بود Randi and Lucchini 2002; Scandura 2004; Verardi et al. 2006) همچنین میزان هتروزیگوستی در گرگ‌های فلاندن (Aspi et al. 2006) تا ۰/۶۶۹ ۰/۶۶۳ تا ۰/۶۳۶ (Aspi et al. 2006)، شمال روسیه (Jedrzejewski et al. 2005)، Bialowieza Primeval (Aspi et al. 2006) و جنگل‌های Lucchini (Lucchini et al. 2004)، عربستان سعودی (Ellegren et al. 2004)، اسکاندیناوی (Forbes and Boyd 1996)، رشته کوه‌های راکی (Forbes and Boyd 1996; Lucchini et al. 2004)، ترکیه (Lucchini et al. 2004) و اسرائیل (Lucchini et al. 2004) نسبت به هتروزیگوستی تخمین زده شده در این مطالعه کمتر بود.

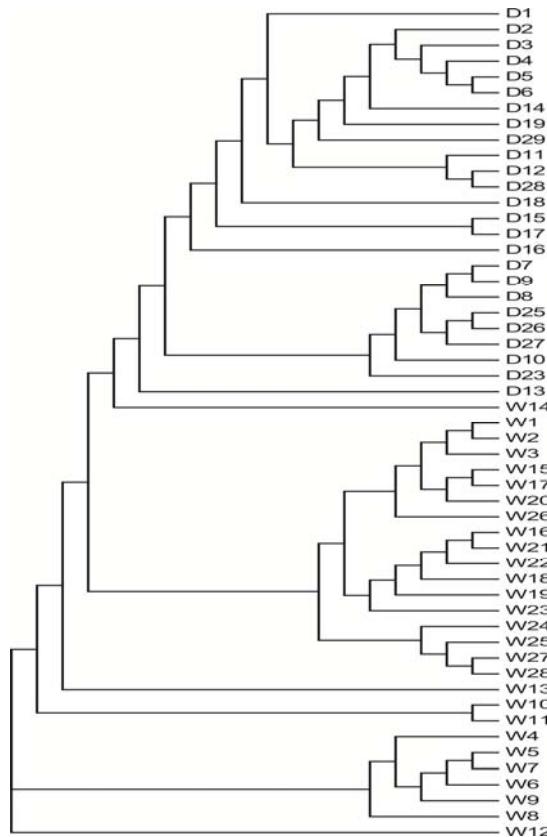
انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در ریزماهواره‌های مطالعه شده می‌تواند ناشی از افزایش هتروزیگوستی، بالا بودن نرخ جهش در ریزماهواره‌ها (Aminafshar et al. 2008) و ساختاربندی ژنتیکی نمونه‌های گرگ استفاده شده در این مطالعه به دلیل رفتار قلمرو طلبانه در گرگ‌ها و جلوگیری از ورود افراد بیگانه به گروه

سگ مورد مطالعه آورده شده است. میزان تنوع ژنتیکی بین نمونه‌های سگ و گرگ (Dst) ۰/۰۲۲ محسابه شد.

درخت فیلوزنی بین افراد با استفاده از الگوریتم اتصال همسایگی و محاسبه شاخص فاصله ژنتیکی ADS با استفاده از نرم‌افزار POPULATION TRSISIM شد (شکل ۲). در این شکل مشخص است که نمونه‌های سگ و گرگ در دو گروه کاملاً مجزا قرار گرفته‌اند، که این امر تایید کننده نتایج بدست آمده از محاسبه شاخص‌های تمایز جمعیتی نی و وایر و کوکرهام بود.

نتایج این مطالعه نرخ بالایی از چندشکلی را در ۱۵ ریزماهواره نشان داد. بالا بودن تعداد آل‌ها و تنوع ژنتیکی در نمونه‌های گرگ (۱۱/۶ آل و نمونه‌های سگ ۹/۴ آل و ۰/۸۳ نشان از تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌های گرگ و سگ کشور بود. همچنین هتروزیگوستی مورد انتظار در بسیاری از ریزماهواره‌های مطالعه شده در جمعیت‌های گرگ کشور بیش از برخی کشورهای اروپایی بود.

هتروزیگوستی مورد انتظار در جمعیت‌های گرگ ایتالیا در رابطه با سه مطالعه صورت گرفته به ترتیب ۰/۴۹۹، ۰/۵۲۰ و ۰/۶۳۲



شکل ۲- درخت فیلوژنی نمونه‌های سگ (D_i) و گرگ (W_i) با استفاده از الگوریتم اتصال همسایگی و شاخص فاصله ژنتیکی ADS (Goldstein et al. 1995; Slatkin 1995) و گرگ (Wright 1969). محاسبه ماتریس ژنتیکی بین افراد و ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار POPULATION 1.2.32 انجام شد

احتمال زیاد ناشی از افزایش هتروزیگوستی در نمونه‌های سگ و گرگ مورد مطالعه بوده است. از سوی دیگر در بسیاری از جمعیت‌های حیات وحش به دلیل مکانیسم‌های رفتاری ویژه در جلوگیری از درون آمیزی با خویشاوندان نزدیک، ضربی درون آمیزی منفی است (Aspi et al. 2009). با این وجود در برخی از مطالعات نرخ بالای درون آمیزی در جمعیت‌های گرگ گزارش شده است که به احتمال فراوان ناشی از قرار گرفتن این جمعیت‌ها در گردنه بطری است (Lucchini et al. 2004; Ramirez et al. 2006).

به دلیل تشابه بالای ژنتیکی دو گونه سگ و گرگ، جفتگیری بین این دو گونه و ورود زن‌های اهلی به درون جمعیت‌های گرگ‌های وحشی می‌تواند به عنوان یک تهدید جدی بر یکپارچگی ژنی گرگ‌ها تلقی شود. افراد دورگه از اختلاط سگ و گرگ (گرگاس) ویژگی‌های رفتاری و بوم شناختی متفاوتی نسبت به گرگ‌های وحشی از خود بروز می‌دهد. لذا این افراد می‌توانند

باشد. یکی از فاکتورهای موثر در تعیین میزان درون آمیزی در یک جمعیت، اندازه جمعیت موثر (N_e) است (Wright 1969). بالا بودن ضربی درون آمیزی زمانی در یک جمعیت دیده می‌شود که جمعیت موثر (N_e) بنیانگذار جمعیت کنونی بسیار کم بوده و در نتیجه روابط خویشاوندی درون جمعیت زیاد باشد. یکی از نتایج افزایش میزان درون آمیزی در یک جمعیت افزایش افراد هموژیگوس و در نتیجه کاهش هتروزیگوستی می‌باشد که در این مطالعه چنین موضوعی مشاهده نشد. از سوی دیگر از آنجا که نمونه‌های گرگ در این مطالعه از گستره وسیعی از محدوده پراکنش این گونه در کشور جمع آوری شده است، لذا احتمال زیادی وجود دارد که این نمونه‌ها مربوط به جمعیت‌های مختلف باشد که این امر می‌تواند یکی دیگر از دلایل عدم تعادل هارددی-واینبرگ باشد.

نتایج محاسبه ضربی درون آمیزی نشان داد که میزان درون آمیزی درون هر یک از جمعیت‌های سگ و گرگ بسیار پایین بود که به

لیتوانی (۰/۳۳) کمتر بود اما شاخص R_{ST} برآورد شده نسبت به مطالعه صورت گرفته در ایتالیا (۰/۲۶) بیشتر بود (Randi and Lucchini 2002; Verardi et al. 2006).

اهلی سازی، نواسانات جمعیتی و واقعی تاریخی سبب شده است که دو گونه سگ و گرگ در طی زمان در رابطه با نشانگرهای ریزماهواره و اگرایی زیادی پیدا کرده و اندازه آلل‌ها در بین دو گونه در طی زمان دستخوش تغییرات زیادی شود (Randi and Luccini 2002). تعداد آلل‌های اختصاصی در دو جمیعت که در تعادل جمیعت شناختی باشند، می‌تواند شاخصی از میزان جریان ژنی (Nm) باشد. ریزماهواره‌های مطالعه شده نرخ بالایی از آلل‌های اختصاصی را در دو گونه سگ و گرگ نشان دادند که بالا بودن تعداد آلل‌های اختصاصی (۳۵ آلل در گرگ‌ها و ۱۸ آلل در سگ‌ها) نشان از تکامل اگرایی این دو گونه در طی زمان و کم بودن جریان ژنی بین دو گونه است. برخی از این آلل‌های اختصاصی دارای فراوانی بالا و برخی از فراوانی بسیار کمی در هر یک از جمیعت‌ها برخوردار بودند (جدول ۳). لازم به ذکر است که برای صحت این نتایج اجرای مطالعاتی با تعداد نمونه‌های بیشتر ضروری به نظر می‌رسد. همچنین نتایج ترسیم درخت فیلوزنیک بین نمونه‌های سگ و گرگ با استفاده از شاخص ADS و الگوریتم اتصال همسایگی نشان داد که نمونه‌های سگ و گرگ دو گروه مجزا را تشکیل می‌دهند.

کاهش تنوع ژنتیکی یکی از مهمترین چالش‌های مدیران حفاظت از حیات وحش در سال‌های اخیر بوده است (Caughley 1996). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که خوبیختانه برخلاف کاهش شدید جمیعت‌های گرگ در بسیاری از زیستگاه‌ها در کشورمان، همچنان نرخ بالایی از تنوع ژنتیکی در بین افراد این گونه در کشور مشاهده می‌شود. حفظ این تنوع ژنتیکی یکی از مهمترین راهکارهای تضمین بقاء طولانی مدت این گونه در زیست بوم‌های کشور است. این مطالعه می‌تواند به عنوان نقطه آغازی برای مطالعات تکمیلی در خصوص حفاظت ژنتیکی از این گوشتخوار کشور باشد.

مشکلات بوم شناختی زیادی را در حفاظت از جمیعت‌های وحشی گرگ بوجود آورند (Wayne and Jenks 1991; Gottelli et al. 1994; Andersone et al. 2002) در ایران نیز به دلیل بالا بودن جمیعت سگ‌های اهلی و یا وحشی و اشغال بسیاری از زیستگاه‌های گرگ، اختلاط این گونه و بروز افراد دورگه محتمل است.

میزان تفاوت ژنتیکی بین این دو گونه در این مطالعه برای دو شاخص وایر و کوکرهام و همچنین اسلاتكین به ترتیب ۰/۰۵۵ و ۰/۳۵۹ بدست آمد که این موضوع تمایز ژنتیکی بین این دو گونه در رابطه با توزیع فراوانی آللی و اندازه آلل‌ها برخلاف تشابهات ژنتیکی این دو گونه نشان می‌دهد. میزان شاخص اسلاتكین نشان داد که حدود ۳۵ درصد از تنوع ژنتیکی مشاهده شده در رابطه با اندازه آلل‌ها بین دو گونه پراکنده است. از آنجا که میزان شاخص F_{ST} بستگی به میزان هتروزیگوستی درون هر یک از جمیعت‌ها بالا زمانی که میزان هتروزیگوستی درون هر یک از جمیعت‌ها بالا باشد، احتمال دارد که این شاخص کمتر از میزان واقعی تخمین زده شود. بنابراین کم بودن شاخص F_{ST} در این مطالعه می‌تواند به دلیل بالا بودن نرخ هتروزیگوستی در هر یک از جمیعت‌های سگ و گرگ باشد. همچنین نتایج نشان داد که شاخص اسلاتكین (۰/۰۳۶) نسبت به شاخص وایر و کوکرهام (۰/۰۵) از قدرت تفکیک بهتری برای جدایی سگ و گرگ برخوردار است. از سوی دیگر شاخص‌های تنوع ژنتیکی وایر و کوکرهام (H_s , H_t , Dst) نیز جدایی ساختار ژنتیکی دو گونه را نشان دادند. شاخص H_s (۰/۸۵۶) نشان داد که بخش زیادی از تنوع ژنتیکی مشاهده شده مربوط به تنوع ژنتیکی درون جمیعت‌ها بوده که این موضوع جدایی ساختار ژنتیکی را نشان می‌دهد.

نتایج محاسبه ضرایب تمایز ژنتیکی وایر و کوکرهام (F_{ST} , Fit , Fis) میزان ارتباطات آللی بین افراد یک جمیعت و افراد جمیعت‌های مختلف را نشان داد. F_{ST} تفاوت بین فراوانی آللی مشاهده شده در مقایسه با فراوانی آللی مورد انتظار را نشان می‌دهد که می‌تواند به عنوان شاخص فاصله ژنتیکی نیز مطرح شود. Fit نیز که میزان ارتباطات آللی در کل جمیعت را نشان می‌دهد از مجموع F_{ST} و Rst محاسبه می‌شود. میزان F_{ST} برآورد شده در این مطالعه نسبت به مطالعات صورت گرفته در کشورهای ایتالیا (۰/۲۴) و

منابع

- Aminafshar M, Amirinia C, Torshizi RV (2008) Genetic diversity in buffalo population of guilan using microsatellite marker. Journal of Animal Veterinary Advance 7: 1499-1502.
- Andersone Z, Lucchini V, Randi E, Ozolins J (2002) Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. Mammalian Biology 67: 79-90.
- Aspi J, Roininen E, Kiiskila J, Ruokonen M, Kojola I, Bljudnik L, Danilov P, Heikkinen S, Pulliainen E (2009) Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. Conservation Genetics 10:815-826.
- Aspi J, Roininen E, Ruokonen M, Kojola I, Vilà C (2006) Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. Molecular Ecology 15:1561-1576.
- Balloux F, Goudet J (2002) Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. Molecular Ecology 11:711-783.
- Boitani L (2003) Wolf conservation and recovery In: Wolves. Behavior, Ecology, and Conservation (eds. Mech LD, Boitani L). The University of Chicago Press, Chicago 317-344.
- Caughley G (1996) Conservation biology in theory and practice. Blackwell Science, Cambridge, MA.
- Ellegren H (1999) Inbreeding relatedness in Scandinavian grey wolves *Canis lupus*. Hereditas 130:239-244.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479-491.
- Forbes S, Boyd H (1996) Genetic variation of naturally colonizing wolves in the central rocky mountains. Conservation Biology 10:1082-1090.
- Goldstein DB, Linares AR, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (1995) An evaluation of genetic distances from use with microsatellite loci. Genetics 139:463-471.
- Gottelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum GD, Roy MS, Girmen DJ, Garcia-Moreno J, Ostrand EA, Wayne RK (1994) Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. Molecular Ecology 3:301-312.
- Goudet J (2001) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)
- Goudet J, Raymond M, DeMeeus T, Rousset F (1996) Testing differentiation in diploid populations. Genetics 144:1933-1940.
- Guo S, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48:361-372.
- Hall SJG, Bradley DG (1995) Conserving livestock breed biodiversity. Trends Ecology and Evolution 10:267-270.
- Hedrick PW (2005) Genetics of Populations, 3rd edn. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts.
- Jêdrzejewski W, Branicki W, Veit C, Medugorac I, Pilot M, Bunovich AN, Jêdrzejewska B, Schmidt K, Theuerkauf J, Okarma H, Gula R, Szymura L, Förster F (2005) Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. Acta Theriologica 50:3-22.
- Keller I, Largiader CR (2002) Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss of genetic variability in ground beetles. Proceeding of the royal society of London biological sciences 270:417-423.
- Kohn MH, York EC, Kamradt DA, Haught G, Sauvajot RM, Wayne RK (1999) Estimating population size by genotyping faeces. Proceedings of the Royal Society London Biology 266:657-663.
- Langella O (2002) Populations 1.2.28 (12/5/2002) Copyright (C) 1999, Olivier Langella, CNRS UPR9034.
- Lucchini V, Galov A, Randi E (2004) Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. Molecular Ecology 13:523-536.
- McRae BH, Beier P, Dewald LE, Huynh LY, Keim P (2005) Habitat barriers limit gene flow and illuminate historical events in a wide-ranging carnivore, the American puma. Molecular Ecology 14:1965-1977.
- Mousadik EL, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree *Argania spinosa* (L.) Skeels endemic to Morocco. Theoretical and Applied Genetics 92:832-839.
- Nanekarani SH, Amirinia C, Amirmozafari N, Vaez Torshizi R, Gharahdaghi AA (2010) Genetic variation among pelt sheep population using microsatellite markers. African Journal of Biotechnology 9:7437-7445.
- Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Ramirez O, Altet L, Ensenat C, Vila C, Sanchez A, Ruiz A (2006) Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. Conservation Genetics 7:861-878.
- Randi E, Lucchini V (2002) Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) population by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. Conservation Genetics 3:31-45.
- Randi E, Lucchini V, Christensen MF, Mucci N, Funk S, Dolf G, Loeschke V (2000) Mitochondrial DNA analysis indicates low genetic variability and no hybridization in Italian wolf but high variability and sporadic hybridization in east European wolves. Conservation biology 14:1-11.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Heredity 86:248-249.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43:223-225.

- Riley SPD, Pollinger JP, Sauvajot RM (2006) A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology* 15:1733-1741.
- Rousset F, Raymond M (1995) Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140:1413-1419.
- Scandura M (2004) The use of microsatellites in the study of social structure in large mammals: Italian wolf and fallow deer as case studies. PhD Thesis, University of Bielefeld, Faculty of Biology.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457-462.
- Sykes WH (1831) Catalogue of the Mammalia of Dukun (Deccan); with observations on the habits, etc., and characters of new species. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1830-1831:99-106.
- Verardi A, Lucchini V, Randi E (2006) Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology* 15:2845-2855.
- Vilà C, Wayne RK (1999) Hybridization between wolves and dogs. *Conservation Biology* 13:195-198.
- Wayne RK, Jenks SM (1991) Mitochondrial-DNA analysis implying extensive hybridization of the endangered red wolf *Canis rufus*. *Nature* 351:565-568.
- Weir BS (1990) *Genetic data analysis: Methods for discrete genetic data*. Sunderland Massachusetts, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Zhang XY, Zhou ML, Zhang XH, Wu DJ (2009) Study on population genetic structure of Liangshan semi-wool sheep using microsatellite markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11:2423-7.
- Ziae H (2009) *A field guide to the mammals of Iran*. Tehran, Iran.