

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گرگ ایرانی و سگ‌های اهلی و ولگرد با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

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 رضایی^۳، شهاب الدین منتظمی^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 جمعیت‌های گرگ و سگ کشور در سال ۱۳۹۰-۱۳۸۰ نمونه‌برداری صورت گرفت و ۲۸ نمونه گرگ و ۲۸ نمونه سگ با استفاده از ۱۵ نشانگر ریزماهوره تعیین ژنوتیپ شده و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها بررسی شد. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و غنای آللی در جمعیت‌های گرگ به ترتیب ۰/۸۵ و ۱۱/۵۶ و برای نمونه‌های سگ ۰/۸۳ و ۹/۳۵ برآورد شد. بالا بودن پارامترهای تنوع ژنتیکی همچون غنای آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و هتروزیگوسیتی مشاهده شده نشان از تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌های 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 ضریب 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 جمعیتی F_{ST} ، R_{ST} و F_{IT} به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۳۶ و ۰/۰۸۴- تخمین زده شد که واگرایی ژنتیکی دو گونه گرگ و سگ را نشان داد. ترسیم درخت فیلوژنی 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 می‌دهد که تنوع ژنتیکی گرگ‌ها در کشور هنوز در سطح قابل قبولی قرار دارد. همچنین با وجود کاهش زیستگاه‌های طبیعی گرگ‌ها در کشور و همجواری آنها با سگ‌های اهلی و ولگرد در حاشیه روستاها، جریان ژنی اندکی بین این گونه با سگ‌های اهلی برقرار بوده و همچنان ساختار ژنتیکی مجزایی را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
درون آمیزی،
ریزماهوره،
گرگ ایرانی،
هتروزیگوسیتی

مقدمه

آگاهی از تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها 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 جمعیت‌ها است (Hall and Bardley 1995; Zhang et al. 2009). عوامل متنوعی همچون انتخاب طبیعی، رانش ژنتیکی، مهاجرت، انتشار، سیستم‌های جفتگیری (McRae et al. 2005)، تخریب و تکه تکه شدن زیستگاه (Keller and Largiader 2002; Riley et al. 2006)، قرار گرفتن جمعیت‌ها در گردنه بطری و کاهش جمعیت‌های طعمه اهمیت بسزایی در تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی دارد.

ریزماهورها نشانگرهای چندریختی^۱ بوده که از هر دو والد به فرزندان منتقل می‌شوند. این نشانگرها کاربرد وسیعی در بررسی تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت‌ها، تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها 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 2000; Randi et al. 1999). بسیاری از متخصصان بیان می‌کنند که جفتگیری طبیعی این دو گونه بسیار نادر بوده و تهدید چندانی را در رابطه با جمعیت‌های گرگ بوجود نمی‌آورد. نتایج استفاده از نشانگرهای مختلف نشان می‌دهد که برخلاف اختلاط بسیار نادر این دو گونه در طبیعت، جمعیت‌های گرگ و سگ از لحاظ ساختار ژنتیکی مجزا بوده و ژنوتیپ‌های بدست آمده با بررسی نشانگرها مختلف توانایی تفکیک جمعیت‌های این دو گونه به گروه‌های مجزا را داشته‌اند (Andersone et al. 2002; Randi and Lucchini 2002; Verardi et al. 2006). گرگ خاکستری محدوده پراکنش وسیعی در اروپا، آمریکای شمالی و آسیا دارد. در سال‌های اخیر جمعیت این گونه در بسیاری از زیستگاه‌های

کشور در اثر دخالت‌های انسانی به شدت کاهش یافته و به صورت جمعیت‌های ایزوله در آمده‌است (Boitani 2003). گرگ هندی یا گرگ ایرانی (Canis lupus pallipes; Sykes 1831) به عنوان زیرگونه‌ای مجزا از گونه گرگ خاکستری معرفی شده که محدوده پراکنش آن شامل هند، پاکستان، ترکیه، عربستان سعودی و ایران است. این گونه در زیستگاه‌های متنوعی از مناطق بیابانی تا جنگل‌ها و بوته‌زارها زیست می‌نماید که این امر سبب تنوع در خصوصیات ریختی و رفتاری این گونه در زیستگاه‌های مختلف شده است. تخریب زیستگاه، شکار مفرط، کاهش جمعیت‌های طعمه و تضاد با بومیان مهمترین فاکتورهای تهدید کننده جمعیت این گونه شناخته می‌شوند که سبب کاهش شدید جمعیت این گونه در بسیاری از زیستگاه‌های کشور شده است (Ziaei 2009). متأسفانه تا کنون اطلاعات دقیقی در خصوص تنوع ژنتیکی این گونه در ایران وجود ندارد. در این مطالعه تلاش شده است تا تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گرگ در کشور مطالعه شود. همچنین در این مطالعه تفاوت ژنتیکی این گونه با سگ‌های اهلی و وحشی و همچنین میزان جریان ژنی بین این دو گونه با استفاده از روش‌های مختلف بررسی شده است. بدین منظور از ۱۵ نشانگر ریزماهور غیر متصل به منظور تعیین ژنوتیپ نمونه‌های جمع آوری شده با هدف تعیین میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گرگ و سگ و همچنین تخمین میزان فاصله ژنتیکی این دو گونه استفاده شد.

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 روستایی) و همچنین گرگ‌های شکار شده به طور غیر قانونی توسط روستاییان و دامداران نقاط مختلف کشور در طی سال‌های

^۱ Polymorphism

^۲ Captive breeding

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

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

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 ریزماهواریها

استخراج DNA با استفاده از کیت‌های استخراج AccuPrep® ساخت شرکت BIO NEER کشور کره صورت گرفت. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، از ۱۵ ریزماهواری 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) توالی آغازگرهای استفاده شده

در این مطالعه و همچنین دمای اتصال هر یک از آغازگرها در جدول ۲ آورده شده است. در این مطالعه سعی شد که از ریزماهواریهای غیرمتصل به یکدیگر استفاده شود تا فرض مستقل بودن ترکیب آلل‌ها در آزمون‌های مختلف رعایت شود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از کیت‌های مخصوص PCR (AccuPower® PCR PerMix kit) ساخت شرکت BIO NEER کره و ترموسایکلر perkin elmer 9600 انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 (که بسته به نوع آغازگر متفاوت بود)، یک دقیقه در دمای ۷۲ 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 امید ۸ درصد الکتروفورز شد (شکل ۱). رنگ آمیزی با استفاده از روش نیترا 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 Analyzere 6 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

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	TTCTTGAGAACAGTGTCTTCG	56°
CPH3	CAGGTTCAAATGATGTTTTCAG	TTGACTGAAGGAGATGTGGTAA	55°
CPH4	ACTGGAGATGAAAACCTGAAGATTATA	TTACAGGGGAAAGCCTCATT	55°
CPH5	TCCATAACAAGACCCCAAAC	GGAGGTAGGGGTCAAAAGTT	55°
CPH6	CATTGGCTGTTTGACTCTAGG	ACTGATGTGGGTGTCTCTGC	57°
CPH7	ACACAACCTTCCATAATACTTCCCA	ATCAATGCTCTCTCCCCAG	58°
CPH8	AGGCTCACAATCCCTCTCATA	TAGATTTGATACCTCCC TGAGTCC	58°
CPH9	CAGAGACTGCCACTTTAAACACAC	AAAGTTCTCAAATACCATTGTGTTACA	58°
CPH12	GGCATTACTTGGAGGGAGGAA	GATGATTCCTATGCTTCTTTGAG	57°
CPH16	CTACACCAGTTAGGGAATCTAGC	CAGATTCAAATCCACTCTCAGAC	57°
CPH22	TCTTTCATTACATTTTGGCTCA	GCCCCAAAATCCGTGTGT	55°
FH2004	CTAAGTGGGGAGCCTCTCT	ACTGTGACCTACTGAGGTTGCA	57°
C20.253	GCAGTCCCTTATTCCAACATG	CCCCAAGTTTGCATCTGTT	57°
CXX.213	AATATGGGAGAGGAGAAGAGGG	ATGCTTCTGGTAAGCAATCA	56°
C09.250	TTAGTTAACCAGCTCCCCCA	TCACCCTGTTAGCTGCTCAA	58°

مارکوو^۷ (Guo and Thompson 1992)، (۲) بررسی افزایش و یا کاهش هتروزیگوسیتی بر اساس هر جایگاه در هر جمعیت (Rousset and Raymond 1995)، (۳) انحراف از تعادل اتصالی^۸ (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 ضریب درون‌آمیزی برای هر جایگاه در هر نمونه با استفاده از روش Weir and Cockerham (1984) استفاده شده در نرم‌افزار GENEPop 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 آلی^۱ کل (Rt) بر اساس روش Mousadik and Petit (1996) و با استفاده از نرم‌افزار FSTAT^۲ 2.9.3 محاسبه شد (Goudet 2001). هتروزیگوسیتی مورد انتظار^۳ (H_E) و مشاهده شده^۴ (H_O) برای هر جایگاه و بر اساس تمامی جایگاه‌ها (Nei 1987) و همچنین تعداد آلل‌های اختصاصی برای هر یک از دو جمعیت سگ و گرگ به صورت جداگانه و با استفاده از نرم‌افزار GENEPop^۵ 4.0.10 محاسبه شد (Raymond and Rousset 1995). از آزمون t مستقل به منظور بررسی تفاوت معنی‌دار بین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و غنای آلی بین دو جمعیت سگ و گرگ استفاده شد (SPSS 15.0; SPSS Inc). از نرم‌افزار GENEPop 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 richness

² <http://softlinks.amnh.org/microsatellites.html>

³ Expected heterozygosity

⁴ Observed heterozygosity

⁵ <http://genepop.curtin.edu.au>

⁶ Hardy-Wienberg equilibrium

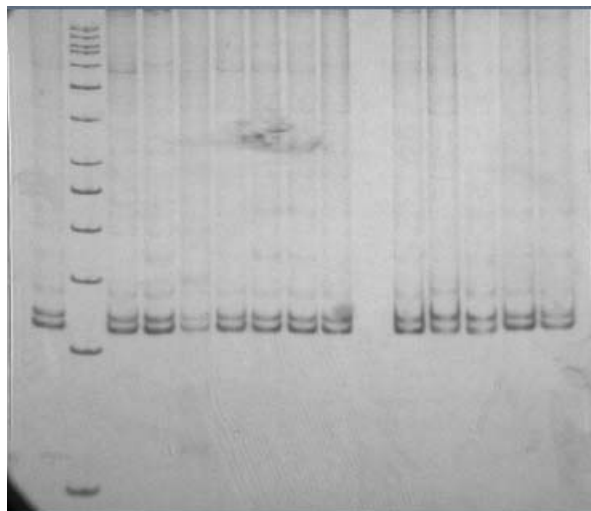
⁷ Markov chain algorithm

⁸ Linkage equilibrium

⁹ Benfferoni

نتایج و بحث

استخراج DNA و تکثیر ریزماهوره‌های مورد مطالعه در رابطه با تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد (شکل ۱). تمامی ریزماهوره‌های 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 ۰/۹۲ تا ۱۶/۶۹ در نمونه‌های گرگ و ۵/۰۰ 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 (۶۶ درصد) و نمونه‌های سگ ۱۸ (۳۴ درصد) آلل را شامل شد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار نسبت به هتروزیگوسیتی 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 t مستقل نشان داد که تفاوت معنی‌داری در رابطه با هتروزیگوسیتی مورد انتظار (که تفاوت معنی‌داری در رابطه با هتروزیگوسیتی مورد انتظار $(\alpha=0/01, df=28, Sig=0/223)$ و غنای آللی $(\alpha=0/01, df=357, Sig=0/357)$ بین دو جمعیت سگ و گرگ در سطح یک درصد وجود ندارد.



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

(Goudet 2002) and بیان می‌کنند زمانی که بین دو جمعیت جریان ژنی کمی برقرار باشد، استفاده از شاخص تمایز اسلاتکین (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 اسلاتکین اجرا شد. در این آزمون واریانس ژنتیکی کل به تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها (σ_{sig})، تنوع ژنتیکی بین افراد داخل هر جمعیت (σ_{sigb}) و تنوع ژنتیکی درون افراد (σ_{sigw}) تقسیم شد. معنی داری آماری شاخص اسلاتکین 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 اسلاتکین، شاخص‌های محاسبه تنوع ژنتیکی و تمایز جمعیتی وایر و کوکرهام (F_{IS} , F_{IT} , 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 GENEPop (<http://genepop.curtin.edu.au>) و آزمون لگاریتم بیشینه (G) و ۱۰۰۰ تکرار در هر بار آنالیز اجرا شد (Raymond and Rousset 1995; Goudet et al. 1996). همچنین از شاخص فاصله ژنتیکی (Goldstein et al. 1995; Slatkin 1995) (ADS) 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 POPULATION 1.2.32 (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations>) صورت گرفت (Langella 2002).

^۱ Neighbor joininng

^۲ <http://bioinformatics.org/project/group>

جدول ۳- نتایج محاسبه غنای آللی در هر جایگاه (Rs)، کل نمونه‌ها (Rt)، هتروزیگوسیتی 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 هتروزیگوسیتی در بین نمونه‌های سگ و گرگ، عدم کاهش هتروزیگوسیتی را نشان داد و هر دو جمعیت سگ و گرگ افزایش هتروزیگوسیتی را نشان دادند ($P < 0.05$; Bonferroni corrected). انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در مطالعاتی که در رابطه با جمعیت‌های گرگ در سایر کشورها نیز صورت گرفته بود نیز گزارش شده‌است (Randi and Lucchini 2002; Verardi et al. 2006). زمانی یک جمعیت می‌تواند در تعادل هاردی-واینبرگ قرار گیرد که توانایی حفظ فراوانی آللی را در نسل‌های متوالی داشته باشد (Nanekarani et al. 2010). ضریب درون آمیزی بین ۰/۰۷- تا ۰/۲۳- در نمونه‌های گرگ و ۰/۰۷- تا ۰/۶۷- در نمونه‌های سگ متغیر بود. میانگین ضریب درون آمیزی برای نمونه‌های سگ و گرگ به ترتیب ۰/۱۲۲- و ۰/۱۴۴- محاسبه شد. منفی بودن ضریب درون آمیزی نشان دهنده افزایش هتروزیگوسیتی نسبت به هتروزیگوسیتی 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; CPH7 - CPH12) در نمونه‌های 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, $\chi^2 = 50.5$; $df = 30$; $P = \text{highly sig.}$) (جدول ۴). انحراف از تعادل ($P < 0.001$) می‌تواند ناشی از افزایش هتروزیگوسیتی، مهاجرت درون هر یک از جمعیت‌های گرگ و سگ، اثر والوند (Wahlund's effect)، جمعیت‌های ساختاری (Structured population) و بالا بودن نرخ جهش در ریزماهورها باشد (Aminafshar et al. 2008).

جدول ۴- نتایج بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ 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	۰/۰۰۳	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	-۰/۲۱۰	۰/۰۰۳	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	-۰/۲۷۸
CPH3	۰/۰۱۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۱۷۶	۰/۰۰۶	۱/۰۰۰	۰/۰۰۲	-۰/۱۷۴
CPH4	۰/۰۵۶	۱/۰۰۰	۰/۰۰۲	-۰/۱۰۶	۰/۰۰۵	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۱۷۰
CPH5	۰/۰۱۱	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۱۰۶	۰/۰۰۴	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۲۱۰
CPH6	۰/۰۳۶	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۱۲۶	۰/۰۱۶	۱/۰۰۰	۰/۰۰۲	-۰/۱۵۶
CPH7	۰/۰۴۳	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	-۰/۱۱۴	۰/۰۲۱	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	-۰/۱۲۲
CPH8	۰/۱۵۳	۱/۰۰۰	۰/۰۰۲	-۰/۰۷۲	۰/۰۴۱	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۱۰۲
CPH9	۰/۰۲۴	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۱۳۴	۰/۰۴۵	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۱۱۶
CPH12	۰/۰۲۵	۱/۰۰۰	۰/۰۰۲	-۰/۱۴۸	۰/۰۳۴	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۱۲۵
CPH16	۰/۰۶۹	۱/۰۰۰	۰/۰۰۲	-۰/۱۰۳	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۳	-۰/۳۴۰
CPH22	۰/۰۰۴	۱/۰۰۰	۰/۰۰۱	-۰/۲۱۳	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۴	-۰/۳۲۰
FH2004	۰/۰۰۲	۱/۰۰۰	۰/۰۰۳	-۰/۲۳۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۴	-۰/۶۶۷
C20.253	۰/۰۲۴	۱/۰۰۰	۰/۰۰۳	-۰/۱۳۳	۰/۱۳۷	۱/۰۰۰	۰/۰۰۵	-۰/۰۷۶
CXX.213	۰/۰۱۸	۱/۰۰۰	۰/۰۰۷	-۰/۱۶۶	۰/۰۱۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۶	-۰/۱۷۷
C09.250	۰/۰۹۰	۰/۹۷۷	۰/۰۰۶	-۰/۱۰۵	۰/۰۰۴	۱/۰۰۰	۰/۰۰۶	-۰/۱۸۳
Total loci				-۰/۱۴۸				-۰/۱۲۲

سگ و گرگ بود ($P < ۰/۰۰۳$). میزان شاخص F_{ST} بین $۰/۰۰۳$ (CPH9) تا $۰/۱۸۱$ (FH2004) متغیر بود. از آنجا که میزان شاخص F_{ST} بستگی به میزان هتروزیگوسیتی جمعیت دارد، لذا بالا بودن میزان هتروزیگوسیتی 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 هتروزیگوسیتی در هر یک از جمعیت‌های سگ و گرگ باشد (Hedrick 2005). نتایج بررسی تفاوت توزیع ژنوتیپی و آللی بین نمونه‌های سگ و گرگ نیز تمایز ژنتیکی بین این دو جمعیت را تأیید کرد. نتایج آزمون فیشر نیز معنی‌داری بالای توزیع ژنوتیپی و آللی را نشان داد ($\chi^2 = \text{infinity}$, $df = 30$, $P = ۰/۰۰۰۰$, Fisher's method).

واگرایی ژنتیکی دو گونه سگ و گرگ در این مطالعه از طریق شاخص تمایز جمعیتی اسلاتکین (R_{ST}) بررسی شد که نسبت به شاخص وایر و کوکرهام در بررسی واگرایی 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 $۰/۰۵$ ، $۰/۱۴۱$ - 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 هتروزیگوسیتی و نرخ درون آمیزی بسیار کم در نمونه‌های سگ و گرگ بود. معنی‌داری آماری دو شاخص F_{ST} و R_{ST} نشان دهنده واگرایی ژنتیکی بین دو گونه سگ و گرگ از لحاظ توزیع فراوانی آللی و اندازه آلل‌ها و همچنین کم بودن جریان ژنی بین این دو گونه می‌باشد ($P < ۰/۰۰۳$). شاخص اسلاتکین در این مطالعه ($R_{ST} = ۰/۳۵۹۵$; $F_{ST} = ۰/۰۵$; $P < ۰/۰۰۳$) و معنی‌داری آماری این شاخص نشان دهنده واگرایی ژنتیکی بین دو گونه سگ و گرگ از لحاظ 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 معنی‌دار 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 Rousset (۱۹۹۶) محاسبه شد.

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	-۰/۳۷۱	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	۳/۸۸	-۱/۴	۸/۲۸
Jackknife (mean $\pm$ se)				-۰/۰۸۴	۰/۰۵۰	-۰/۱۴۱				
				$\pm ۰/۰۳۵$	$\pm ۰/۰۱۳$	$\pm ۰/۰۲۵$				

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 هتروزیگوسیتی در گرگ‌های فنلاند ۰/۶۶۳ تا ۰/۶۶۹ (Aspi et al. 2006)، شمال روسیه ۰/۶۳۶ تا ۰/۷۰۹ (Aspi et al. 2006) و جنگل‌های Bialowieza Primeval (Jedrzejewski et al. 2005)، کرواسی ۰/۶۹۰ (Lucchini et al. 2004)، عربستان سعودی ۰/۴۲۰ (Lucchini et al. 2004)، اسکندیناوی ۰/۵۲۰ (Ellegren 1999)، رشته کوه‌های راکو ۰/۶۰۷ (Forbes and Boyd 1996; Lucchini et al. 2004)، ترکیه و اسرائیل ۰/۶۷۰ (Lucchini et al. 2004) و ایالت آلبرتا ۰/۵۸۱ (Forbes and Boyd 1996) نسبت به هتروزیگوسیتی تخمین زده شده در این مطالعه کمتر بود.

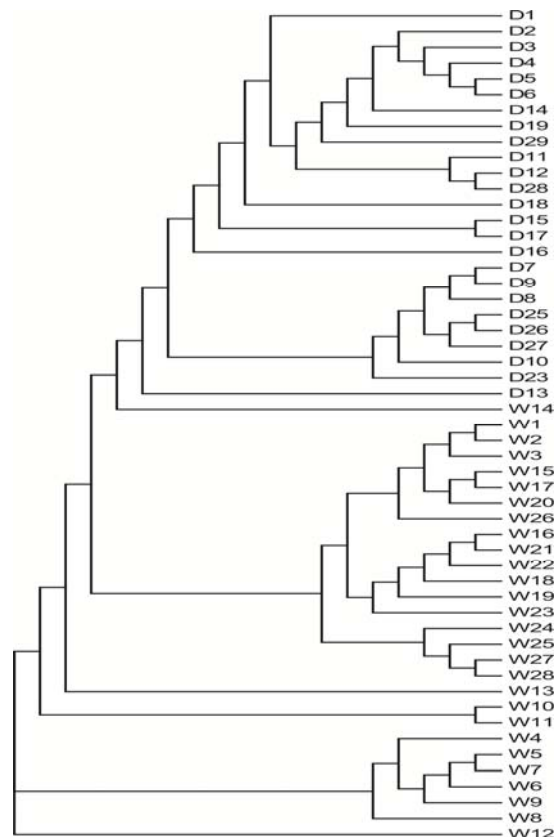
انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در ریزماهواره‌های مطالعه شده می‌تواند ناشی از افزایش هتروزیگوسیتی، بالا بودن نرخ جهش در ریزماهواره‌ها (Aminafshar et al. 2008) و ساختاربندی ژنتیکی نمونه‌های گرگ استفاده شده در این مطالعه به دلیل رفتار قلمروطلبانه در گرگ‌ها و جلوگیری از ورود افراد بیگانه به گروه

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

درخت فیلوژنی بین افراد با استفاده از الگوریتم اتصال همسایگی و محاسبه شاخص فاصله ژنتیکی ADS با استفاده از نرم‌افزار POPULATION ترسیم 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 آلل‌ها و تنوع ژنتیکی در نمونه‌های گرگ (۱۱/۶ آلل ۰/۸۵) و نمونه‌های سگ (۹/۴ آلل و ۰/۸۳) نشان از تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت‌های گرگ و سگ کشور بود. همچنین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در بسیاری از ریزماهواره‌های مطالعه شده در جمعیت‌های گرگ کشور بیش از برخی کشورهای اروپایی بود.

هتروزیگوسیتی 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 (Goldestin et al. 1995; Slatkin 1995). 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 هتروزیگوسیتی 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، ضریب 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 ژن‌های 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 ضریب 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 هموزیگوس و در نتیجه کاهش هتروزیگوسیتی 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 جمع‌آوری 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 هاردی-واینبرگ باشد.

نتایج محاسبه ضریب 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 وقایع تاریخی سبب شده است که دو گونه سگ و گرگ در طی زمان در رابطه با نشانگرهای ریزماهواره واگرایی زیادی پیدا کرده و اندازه آلل‌ها در بین این دو گونه در طی زمان دستخوش تغییرات زیادی شود (Randi and Lucchini 2002). تعداد آلل‌های اختصاصی در دو جمعیت که در تعادل جمعیت 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 واگرایی 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 جمعیت‌ها 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 فیلوژنیک 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 خوشبختانه بر خلاف کاهش شدید جمعیت‌های 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 جمعیت‌های وحشی گرگ بوجود آورند (Wayne and Jenks 1991; Gottelli et al. 1994; Anderson et al. 2002). در ایران نیز به دلیل بالا بودن جمعیت 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 اسلاتکین 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 بر خلاف تشابهات ژنتیکی این دو گونه نشان می‌دهد. میزان شاخص اسلاتکین نشان داد که حدود ۳۵ درصد از تنوع ژنتیکی مشاهده شده در رابطه با اندازه آلل‌ها بین دو گونه پراکنده شده است. از آنجا که میزان شاخص F_{ST} بستگی به میزان هتروزیگوسیتی جمعیت دارد، لذا زمانی که میزان هتروزیگوسیتی درون هر یک از جمعیت‌ها 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 هتروزیگوسیتی در هر یک از جمعیت‌های سگ و گرگ باشد. همچنین نتایج نشان داد که شاخص اسلاتکین (۰/۳۶) 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 , D_{ST}) 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 به تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بوده که این موضوع جدایی ساختار ژنتیکی را نشان می‌دهد.

نتایج محاسبه ضرایب تمایز ژنتیکی وایر و کوکرهام (F_{ST} , F_{IT} , F_{IS}) میزان ارتباطات آللی بین افراد یک جمعیت و افراد جمعیت‌های 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. F_{IT} نیز که میزان ارتباطات آللی در کل جمعیت را نشان می‌دهد از مجموع F_{ST} و R_{ST} 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, Girman DJ, Garcia-Moreno J, Ostranders 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.
- Jędrzejewski W, Branicki W, Veit C, Medugorac I, Pilot M, Bunevich AN, Jędrzejewska 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, Loeschcke 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.
- Ziaei H (2009) A field guide to the mammals of Iran. Tehran, Iran.