

## Genetic structure of Afghan Pika (*Ochotona rufescens*) in Northern Khorasan Province

Olyagholi Khalilipour<sup>1\*</sup>, Afshin Alizadeh Shabani<sup>2</sup>, Hamid Reza Rezaei<sup>3</sup>, Mohammad Kaboli<sup>4</sup>,  
Sohrab Ashrafi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor Department of Environmental Sciences, Faculty of Marine Natural Resources,  
Khorranshahr University of Marine Science and Technology, Iran.

<sup>2</sup> Assistant Professor Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and  
Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>3</sup> Assistant Professor Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and  
Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>4</sup> Associate Professor Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and  
Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>5</sup> Assistant Professor Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and  
Natural Resources, Gorgan, Iran.

### Abstract

The aim of this research was to study the genetic structure of the Afghan Pika's (*Ochotona rufescens*) populations in Northern Khorasan province in order to determine their isolation rate. A total of 122 samples from four sample groups (Ghorkhod, Golol-Sarani, Salouk and Sarigol) were selected and the genotypic features were detected using 7 microsatellite loci. The results showed that all of the loci were subject to polymorphism and the allele ranged from 2 – 7. Significant  $F_{st}$  and  $R_{st}$  values were found among the populations based on the AMOVA test. Based on the Assignment Test, more than 90 percent of the individuals of the populations belonged to their original population (only 10 percent of the individuals belonged to other populations). A Paired comparison of genetic differentiation between the populations revealed significant differences among them. The results of the Prichard model grouping showed that the samples collected in this study were approximately 7 groups. The results of AMOVA analysis revealed a significant genetic structure among different populations. Also, the majority of the variance is related to the variance within the population. There seems to be a different but small genetic structure among the studied populations.

**Key words:** Afghan Pika, *Ochotona rufescens*, Microsatellite loci,  $F_{st}$ ,  $R_{st}$ , Assignment test and AMOVA.

\* o.khalilipour@kmsu.ac.ir

## ساختار ژنتیکی جمعیت‌های پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*) در استان خراسان شمالی

اولیاقلی خلیلی پور<sup>۱\*</sup>، افشین علیزاده شهپانی<sup>۲</sup>، حمیدرضا رضایی<sup>۳</sup>، محمد کابلی<sup>۴</sup>، سهراب اشرفی<sup>۵</sup>  
<sup>۱</sup> استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر ایران  
<sup>۲</sup> استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران  
<sup>۳</sup> استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ایران  
<sup>۴</sup> دانشیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران  
<sup>۵</sup> استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

### چکیده

هدف مطالعه حاضر، بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*) در خراسان شمالی برای دستیابی به میزان جدایی جمعیت‌های آن است. ۱۲۲ نمونه متعلق به چهار جمعیت پایکای افغانی (قورخود، گلول - سرانی، سالوک و ساریگل) صید و ویژگی‌های ژنوتیپی آنها با استفاده از هفت نشانگر ریزماهواره بررسی شدند. نتایج نشان دادند تمام لوکوس‌های مطالعه شده چندریختی دارند و تعداد آلل‌ها در این جایگاه‌ها بین دو تا هفت آلل متغیر است. بر اساس روش تحلیل واریانس مولکولی،  $F_{st}$  و  $R_{st}$  معناداری بین جمعیت‌های بررسی شده وجود دارد. نتایج آزمون تطبیقی نشان دادند نسبت زیادی از افراد کل جمعیت‌ها (۹۰ درصد) به درستی به جمعیت اولیه متعلق بودند و فقط ۱۰ درصد افراد جمعیت‌ها از سایر جمعیت‌ها مهاجرت کرده‌اند. بررسی تفاوت ژنتیکی جفتی بین جمعیت‌های بررسی شده نیز نشان داد تفاوت جفتی بین جفت جمعیت‌های مختلف بر اساس  $F_{st}$ ، رابطه معناداری در تمام مقایسه‌های جفتی نشان می‌دهد. نتایج گروه‌بندی الگوی پریچارد نیز نشان دادند نمونه‌های جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر تقریباً هفت گروه تشکیل می‌دهند. نتایج تحلیل AMOVA، وجود ساختار ژنتیکی معناداری بین جمعیت‌های مختلف بررسی شده نشان دادند و بیشتر واریانس به واریانس درون جمعیت‌ها مربوط بود. به نظر می‌رسد ساختار ژنتیکی مختلف هرچند اندک بین جمعیت‌های مطالعه شده وجود دارد.

**واژه‌های کلیدی:** پایکای افغانی، *Ochotona rufescens*، نشانگرهای ریزماهواره،  $F_{st}$ ،  $R_{st}$ ، آزمون تطبیقی و

AMOVA

\* o.khalilipour@kmsu.ac.ir

## مقدمه

تغییر و نابودی زیستگاه‌ها، خطرناک‌ترین عامل برای بقای بسیاری از گونه‌های گیاهی و جانوری به شمار می‌آید (Bailie *et al.*, 2004). گونه‌هایی که در حال حاضر با چنین خطری روبه‌رو هستند، بیشتر به جمعیت‌های کوچک و جداافتاده محدود شده‌اند و معمولاً جریان ژن بین آنها به شدت کاهش یافته است (Segelbacher *et al.*, 2003; Randi *et al.*, 2003). به‌مرور زمان، چنین جمعیت‌های کوچک و جداافتاده‌ای تنوع ژنتیکی خود را از دست می‌دهند و ممکن است با انقراض محلی روبه‌رو شوند (Frankham, 2005). عواملی که جریان ژن و سازگاری محلی را در این جمعیت‌ها کنترل می‌کنند، نامشخص و بسیاری از پرسش‌های مربوط به روابط الگوهای سیمای سرزمین و ساختار ژنتیکی، بی‌پاسخ هستند؛ باوجوداین، پاسخ به چنین پرسش‌هایی برای مدیریت مطلوب جمعیت‌های جانوری و گیاهی امری حیاتی است. استفاده از مباحث ژنتیکی، یکی از روش‌هایی است که به موضوع یادشده می‌پردازد و روش‌های مولکولی بسیاری برای پی‌بردن به وضعیت گونه‌ای از نظر ژنتیکی توسعه یافته‌اند (Lin *et al.*, 2010). سیتوکروم ب و *ND4* از ژن‌های میتوکندری و همچنین ریزماهوره‌ها بیشتر از سایر ژن‌ها برای پی‌بردن به ساختار ژنتیکی پایکاها استفاده شده‌اند. نتایج مطالعه‌ها بر اساس ژن‌های یادشده نشان می‌دهند معمولاً تغییرات ژنتیکی درون جمعیت پایکاها نسبت به بین جمعیت‌ها بیشتر است، هرچند با افزایش وسعت منطقه مطالعه در سطح کلان، تفاوت تغییرات ژنتیکی بین جمعیت‌ها نسبت به درون جمعیت‌ها بیشتر می‌شود. در برخی پایکاها، ساختار ژنتیکی معناداری در شیب ارتفاعی و شیب عرض جغرافیایی مشاهده می‌شود.

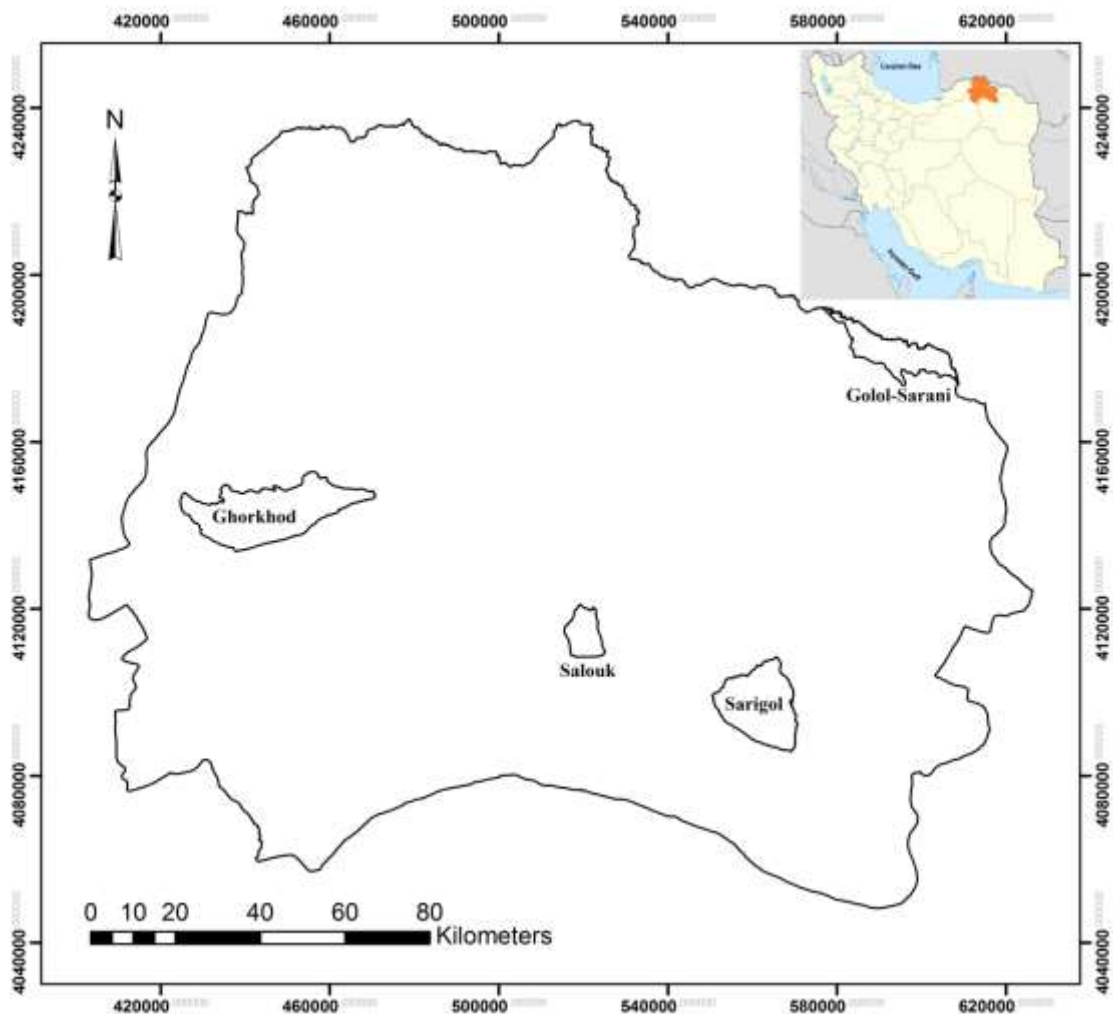
پایکاهای جوان، پراکندگی محدودی در حدود ۳۰۰ متر از محل تولد خود دارند و این فاصله در پایکاهای بالغ به ۶۰۰ متر می‌رسد. همچنین با وجود پدیده گردن‌بطری، جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی خود را حفظ می‌کنند که احتمالاً به علت مهاجرت معدودی از افراد سایر جمعیت‌ها به داخل هر جمعیت است. معمولاً گسترش سریع کنونی در جمعیت پایکاها مشاهده می‌شود. از آنجا که ریزماهوره‌ها از راه کروموزوم‌های غیرجنسی هر دو جنس به فرزندان منتقل می‌شوند، هر فرد نسخه‌ای از آن را از مادر و نسخه‌ای را از پدر به ارث می‌برد. تنوع زیاد، زیادبودن میزان جهش، چندریختی زیاد در این نشانگرها به دلیل تفاوت طول آنها و در نتیجه تفاوت نوع آلل‌ها سبب شده‌اند ریزماهوره‌ها کاربرد وسیعی در مطالعه‌های جمعیتی داشته باشند. مطالعه‌های Castillo و همکاران (۲۰۱۴) بر اساس سیتوکروم ب و ریزماهوره‌ها، مطالعه‌های Lisovsky و همکاران (۲۰۱۴) و Olson و Lanier (۲۰۱۲) بر اساس ژن‌های میتوکندری از جمله مطالعه‌ها در این زمینه هستند. در پژوهش حاضر، ساختار ژنتیکی جمعیت‌های پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*) در خراسان شمالی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره بررسی شد تا میزان جدایی بین جمعیت‌ها برآورد شود.

## مواد و روش‌ها

### منطقه مطالعه‌شده

محدوده مطالعه‌شده دربرگیرنده چهار منطقه در گستره گیتاشناختی استان خراسان شمالی است. این استان از نظر ناهمواری‌ها به دو بخش نواحی کوهستانی و نواحی پست و هموار تقسیم می‌شود و مرتفع‌ترین نقطه آن، قله شاه جهان در رشته‌کوه‌های

آلاداغ، ۳۰۵۱ متر ارتفاع دارد. ارتفاع متوسط استان، ۱۳۲۶ متر از سطح دریاست. چهار منطقه مطالعه شده در این استان عبارتند از: پارک ملی و منطقه حفاظت شده ساریگل؛ پارک ملی سالوک؛ منطقه حفاظت شده قورخود؛ منطقه حفاظت شده گلول - سرانی (شکل ۱).



شکل ۱- موقعیت مکانی مناطق مطالعه شده در استان خراسان شمالی

که در پژوهش‌های پیشین درباره گونه‌های دیگر پایکا استفاده شده بودند (Zgurski *et al.*, 2008).

### روش اجرای پژوهش

استخراج DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت ویژه استخراج DNA از بافت، ساخت شرکت بیونیر انجام شد. از هفت آغازگر ریزماهواره (جدول ۱) استفاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در پژوهش حاضر

نام نشانگر	توالی آغازگر	شماره ثبت شده در بانک ژن	تعداد چرخه	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)
Ocp1	F: AGTGACATAAAATGACGGGACA R: TCAGACCCAACACTCAACACAG	AF487492	۳۵	۵۵
Ocp3	F: CAGCCATCTGGACAATGAAACTAA R: GGAACATTTGCCGTTGTAGAAAG	AF487494	۳۵	۵۵
Ocp4	F: CACTAGGTTATTGCGCCAGGGT R: CTGCTTCTGGTTTCAGCCTGACT	AF487495	۳۵	۵۹
Ocp5	F: CAAGTTCGGCTTTGCTCAGTTC R: GTACATGCAGTGGCAAGGGTTGA	AF487496	۳۵	۵۵
Ocp6	F: GGCTTCAGATTTCTCAACACC R: CCACCTGACTTCTGCAACTTCT	AF487497	۳۵	۵۵
Ocp7	F: ATCCTGAGCTATCTTTGCCATT R: CCCAAAACCTCTTGAGAGACA	AF487498	۳۵	۵۵
Ocp8	F: TTCTCTGGAGTCCTCTAACCC R: CCTCGAGCAAGTTTGGTTGTT	AF487499	۳۵	۵۹

رنگ آمیزی شدند و برای شناسایی اندازه باندها از نرم افزار Gel analyzer 2010 استفاده شد.

### تحلیل داده‌ها

در مطالعه حاضر، از نرم افزار GenAlex نسخه ۶/۵ (Peakall and Smouse, 2012) برای تعیین تعادل هاردی- واینبرگ استفاده شد که بر اساس روش Hedrick (۲۰۰۰) و با استفاده از آزمون کای-اسکویر انجام می شود. از نرم افزار MicroCheker نسخه ۲/۲/۳ (Van Oosterhout *et al.*, 2004) برای بررسی وجود داشتن آلل نول بین آلل های هر لوکوس استفاده شد. بررسی ناپیوستگی ژنوتیپی (Linkage disequilibrium) با نرم افزار Arlequin نسخه ۳/۵ (Rousset, 2008) محاسبه شد.

پس از انتخاب نشانگرهای مدنظر، واکنش PCR برای هر یک از آغازگرهای ریزماهواره انجام شد. به این منظور، برای تکثیر توالی های مدنظر از Master Mix های ساخت شرکت سیناژن با حجم ۱۲ میکرولیتر استفاده شد. برنامه حرارتی چرخه PCR با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره به شرح زیر بود: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه؛ واسرشت سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۳۵ دور؛ اتصال آغازگرها در دمای بین ۵۵ تا ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ گسترش زنجیره در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۵ ثانیه؛ گسترش نهایی زنجیره در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. پس از تکثیر توالی های مدنظر، محصول PCR به مدت ۴ ساعت با ولتاژ ۱۶۰ ولت در دستگاه الکتروفورز عمودی ساخت شرکت بیونیر با ابعاد ۲۰×۲۰ سانتی متر و ژل آکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز محصول PCR، ژل ها به روش نترات نقره

اساس ژنوتیپ خود ممکن است به یک گروه تعلق داشته باشد. همان‌طور که گفته شد تبعیت لوسی‌ها از تعادل هاردی - واینبرگ و ترکیب تصادفی آلل‌ها در لوسی‌های مختلف، دو فرض اساسی و مهم در استفاده از الگوی پریچارد هستند. در مطالعه حاضر، از الگوی ترکیبی یا اختلاطی در نرم‌افزار Structure استفاده شد. فرض روش این بود که هیچ اطلاعاتی از پیش درباره تعداد جمعیت نمونه‌ها وجود ندارد و گروه‌بندی نمونه‌ها در این الگو بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی انجام نشد. تعداد مناسب K برای این داده‌ها با قراردادن K بین ۱ تا ۱۰ ( $MAXPOPS=1-10$ ) و محاسبه احتمال بیشینه داده‌ها ( $Ln P(D)$ ) محاسبه شد. چنانچه نمونه‌های مطالعه‌شده بیش از یک جمعیت را تشکیل دهند، انتظار می‌رود احتمال بیشینه داده‌ها با افزایش میزان K افزایش یابد (Pritchard *et al.*, 2000). محاسبه میزان فاصله ژنتیکی یکی از راه‌های بررسی میزان واگرایی ژنتیکی و تکاملی میان جمعیت‌ها و یا افراد مختلف است. برای رسم درخت تبارشناسی، ابتدا میزان فاصله ژنتیکی بین افراد با استفاده از نرم‌افزار Population نسخه ۲/۳/۲ محاسبه شد. در مطالعه حاضر، از شاخص کاوالی - سفروزا (Dc) برای محاسبه فاصله ژنتیکی بین افراد استفاده شد. پس از تشکیل ماتریس فاصله ژنتیکی بین افراد، درخت تبارشناسی بین جمعیت‌ها بر اساس الگوریتم اتصال همسایگی در نرم‌افزار Mega نسخه ۵/۲ رسم شد. هدف از رسم این نمودار، بررسی میزان واگرایی جمعیت‌ها و گروه‌بندی نمونه‌ها بود. برای بررسی وجود داشتن یا نداشتن رابطه بین ماتریس فاصله ژنتیکی و ماتریس فاصله اقلیدوسی از آزمون متل و نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶/۵ استفاده شد. نرم‌افزار یادشده برای محاسبه آزمون تطبیقی نیز استفاده شد.

شاخص  $F_{IS}$  میزان درون‌آمیزی هر یک از جمعیت‌های مطالعه‌شده و میزان هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر، میزان درون‌آمیزی برای هر نشانگر در هر جمعیت با استفاده از روش وایر - کوکرهام محاسبه و برآوردی کلی از این شاخص بر اساس تمام لوکوس‌ها با استفاده از روش وایر - کوکرهام و رابرتسون - هیل با استفاده از نرم‌افزار GENEPop انجام شد (خسروی، ۱۳۹۰). آزمون تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA)، یکی از روش‌های بررسی ساختار ژنتیکی و میزان واگرایی جمعیت‌ها از یکدیگر است. در مطالعه حاضر، از نرم‌افزار Arlequin نسخه ۳/۵ برای اجرای آزمون تحلیل واریانس مولکولی و بررسی میزان تفاوت در ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مطالعه‌شده استفاده شد. یکی از روش‌های گروه‌بندی جمعیت‌ها، استفاده از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای داده‌های ژنتیکی است؛ این روش در نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶/۵ (Peakall and Smouse, 2012) اجرا و ابتدا فاصله ژنتیکی جفت افراد بر اساس تمام نمونه‌ها محاسبه و سپس، گروه‌بندی نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار انجام شد. یکی دیگر از راه‌های بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، ارزیابی تفاوت لوسی‌های متعدد به دلیل تفاوت در فراوانی آلل‌ها و بروز لوسی‌هایی با طول‌های مختلف است. بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای ریزماهواره به ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها پی برده می‌شود. Pritchard و همکاران (۲۰۰۰) برای نخستین بار این الگو را معرفی کردند که در نرم‌افزار Structure اجرا می‌شود (خسروی، ۱۳۹۰). در این روش، فرض بر این است که نمونه‌های مدنظر، K گروه مستقل از نظر ژنتیکی تشکیل می‌دهند و هر نمونه بر

## نتایج

Ocp8 در منطقه حفاظت شده گلول - سرانی، نشانگر Ocp6 در پارک ملی سالوک و فقط نشانگر Ocp3 در پارک ملی ساریگل از تعادل هاردی - واینبرگ انحراف داشتند. نتایج آزمون کلی درباره هر نشانگر در کل نمونه‌ها نیز مشخص کردند بجز Ocp3 و Ocp7، سایر نشانگرها از تعادل هاردی - واینبرگ انحراف دارند. نتایج بررسی ترکیب آلل‌ها نشان دادند در سه منطقه گلول - سرانی، سالوک و ساریگل، پیوستگی ژنوتیپی میان لوکوس‌ها در بیشتر موارد وجود ندارد و ترکیب آلل‌ها در هر نشانگر، تصادفی و مستقل از لوکوس‌های دیگر است. تعداد پیوستگی ژنتیکی در منطقه حفاظت شده قورخود تقریباً زیاد (۸ نمونه از ۲۱ نمونه مقایسه جفتی) بود و به عبارتی، فرض ناپیوستگی ژنوتیپی در سه منطقه گلول - سرانی، سالوک و ساریگل بین لوکوس‌ها پذیرفته می‌شود ( $p > 0.05$ ). همچنین، آلل نول فقط در دو نمونه مشاهده شد که به مناطق ساریگل و گلول - سرانی مربوط بودند.

در مطالعه حاضر، ژنوتیپ ۱۲۲ نمونه متعلق به چهار جمعیت پایکای افغانی با استفاده از هفت نشانگر ریزماهواره تعیین شد و آلل‌های هر فرد برای هر نشانگر مشخص شدند. تمام لوکوس‌های مطالعه شده، چندریختی نشان دادند و تعداد آلل‌ها در این لوکوس‌ها بین دو تا هفت آلل متغیر بود (جدول ۲). تعداد آلل‌های اختصاصی در منطقه حفاظت شده قورخود، سه آلل؛ منطقه حفاظت شده گلول - سرانی، سه آلل؛ پارک ملی سالوک، سه آلل و پارک ملی ساریگل، چهار آلل بود (جدول ۲). بیشترین میزان آلل‌های اختصاصی در نشانگرهای Ocp4 و Ocp8 مشاهده شدند. نتایج بررسی تبعیت لوکوس‌ها از تعادل هاردی - واینبرگ نشان دادند تمام نشانگرها در سه منطقه ساریگل، سالوک و قورخود از تعادل هاردی - واینبرگ تبعیت می‌کنند و فقط دو نشانگر در منطقه حفاظت شده گلول - سرانی در تعادل هستند. نشانگرهای Ocp3، Ocp4، Ocp7 و

جدول ۲- نتایج بررسی وضعیت ژنتیکی در مناطق مطالعه شده بر اساس نشانگرهای ریزماهواره

نام نشانگر	سالوک	ساریگل	گلول - سرانی	قورخود	کل
Ocp1	تعداد آلل	۷	-	۶	۷
	اندازه باند	۳۳۸-۲۹۴	-	۳۳۸-۲۹۴	۳۳۸-۲۹۴
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۸۴۹	-	۰/۸۰۲	۰/۸۲۵
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۷۱۸	-	۰/۷۰۰	۰/۷۰۹
Ocp3	تعداد آلل	۷	۷	۷	۸
	اندازه باند	۳۳۸-۲۷۴	۲۳۸-۱۷۴	۳۳۱-۲۷۴	۳۳۸-۱۷۴
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۷۱	۰/۷۷۹	۰/۸۴۵	۰/۷۹۵
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۸۳۳	۱/۰۰	۰/۹۵۶	۰/۹۰۵
Ocp4	تعداد آلل	۴	۳	۶	۸
	اندازه باند	۲۹۰-۲۰۶	۳۳۸-۲۷۴	۳۳۳-۱۹۴	۳۳۳-۱۹۴
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۶۵۶	۰/۴۴۱	۰/۷۶۶	۰/۵۷۸
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۵۹۲	۰/۳۲۲	۰/۸۴۰	۰/۵۲۱

نام نشانگر	سالوک	ساریگل	گلول - سرانی	قورخود	کل
Ocp5	تعداد آلل	۵	۲	۲	۷
	اندازه باند	۲۳۵-۲۱۱	۲۳۵-۲۰۵	۲۱۱-۲۰۵	۲۲۹-۲۰۵
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۸۱	۰/۵۰۸	۰/۲۸۳	۰/۷۱۸
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۷۹۱	۰/۳۴۴	۰/۱۶۶	۰/۵۷۱
Ocp6	تعداد آلل	۴	۵	۶	۵
	اندازه باند	۳۸۴-۳۴۷	۴۰۰-۳۳۵	۴۰۰-۳۳۵	۴۰۰-۳۴۷
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۶۴۸	۰/۷۰۰	۰/۷۹۰	۰/۷۵۷
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۴۶۴	۰/۴۷۸	۰/۸۲۶	۰/۶۴۰
Ocp7	تعداد آلل	۵	۴	۴	۶
	اندازه باند	۲۹۱-۱۹۱	۲۲۹-۱۹۱	۲۲۹-۱۸۰	۲۲۹-۱۸۰
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۵۳	۰/۶۹۰	۰/۷۰۹	۰/۷۴۷
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۹۳۱	۰/۷۴۰	۰/۷۵۰	۰/۶۴۲
Ocp8	تعداد آلل	۶	۳	۳	۶
	اندازه باند	۲۵۷-۲۱۵	۲۳۰-۲۰۵	۲۳۹-۲۱۵	۲۵۷-۲۱۵
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۷۲	۰/۶۵۵	۰/۶۵۷	۰/۷۷۳
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۶۷۸	۰/۸۴۳	۰/۰۷۴	۰/۶۵۵

در بین جمعیت‌های قورخود و گلول - سرانی تقریباً زیاد است و جمعیت‌های سالوک و ساریگل درون آمیزی کمی دارند (جدول ۳).

نتایج محاسبه شاخص درون آمیزی بر اساس روش‌های وایر - کوکرهام و رابرتسون - هیل نشان دادند بر اساس هر دو روش مطالعه، میزان درون آمیزی

جدول ۳- برآوردی از درون آمیزی در جمعیت‌های مطالعه شده بر اساس دو شاخص رابرتسون - هیل و وایر - کوکرهام

نشانگر	رابرتسون - هیل			وایر - کوکرهام		
	قورخود	گلول - سرانی	سالوک	ساریگل	قورخود	گلول - سرانی
Ocp1	۰/۲۲۸	-	-	۰/۱۵۱	۰/۱۲۹	-
Ocp3	-۰/۰۲۳	-۰/۱۱۳	-۰/۰۸۴	-۰/۱۵۲	-۰/۰۶۳	-۰/۱۳۴
Ocp4	۰/۲۷۱	۰/۰۰۷	۰/۰۹۰	۰/۲۶۳	۰/۲۶۵	-۰/۰۹۸
Ocp5	۰/۱۴۲	۰/۴۳۰	-۰/۰۲۵	۰/۳۳۲	۰/۲۰۸	۰/۴۱۷
Ocp6	۰/۱۲۷	-۰/۰۶۸	۰/۳۲۳	۰/۱۸۲	۰/۱۵۷	-۰/۰۴۶
Ocp7	۰/۱۲۴	-۰/۰۸۹	-۰/۱۷۲	-۰/۰۵۳	۰/۱۴۲	-۰/۰۵۷
Ocp8	۰/۲۳۰	۰/۹۰۴	۰/۰۵۴	-۰/۲۹۰	۰/۱۵۵	۰/۸۸۹
تمام نشانگرها	۰/۱۵۷	۰/۱۷۸	۰/۰۳۱	۰/۰۷۲	۰/۱۳۱	۰/۱۲۲



توزیع اندازه آللی با یکدیگر متفاوت بودند، میزان شاخص Fst بسیار کمتر از Rst بود و تفاوت دو جمعیت بیشتر بر اساس اندازه آلل هاست (جدول ۴) (خسروی، ۱۳۹۰).

بر اساس روش تحلیل واریانس مولکولی، دو شاخص محاسبه شده Fst و Rst بین جمعیت‌های بررسی شده معنادار بودند. به عبارتی، اگرچه جمعیت‌های مطالعه شده از نظر توزیع فراوانی آللی و

جدول ۴- نتایج بررسی شاخص‌های Fst و Rst با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بدون گروه‌بندی

P-value	شاخص تنبیت	درصد واریانس	
<b>تحلیل بر اساس Fst</b>			
p<۰/۰۰۰	Fst=۰/۰۹۴	۹/۴۹	بین جمعیت‌های مختلف
		۹۰/۵۱	درون جمعیت‌ها
<b>تحلیل بر اساس Rst</b>			
P<۰/۰۰۰	Rst=۰/۳۰	۳۰/۶۶	بین جمعیت‌های مختلف
		۶۹/۳۴	درون جمعیت‌ها

ژنتیکی نی (Nei's genetic distance) نیز رابطه معناداری بین تمام جفت جمعیت‌ها نشان می‌دهد. مقدار تفاوت ژنتیکی کم و جریان ژن زیاد بین جمعیت‌های مطالعه شده مشاهده می‌شود (جدول ۵).

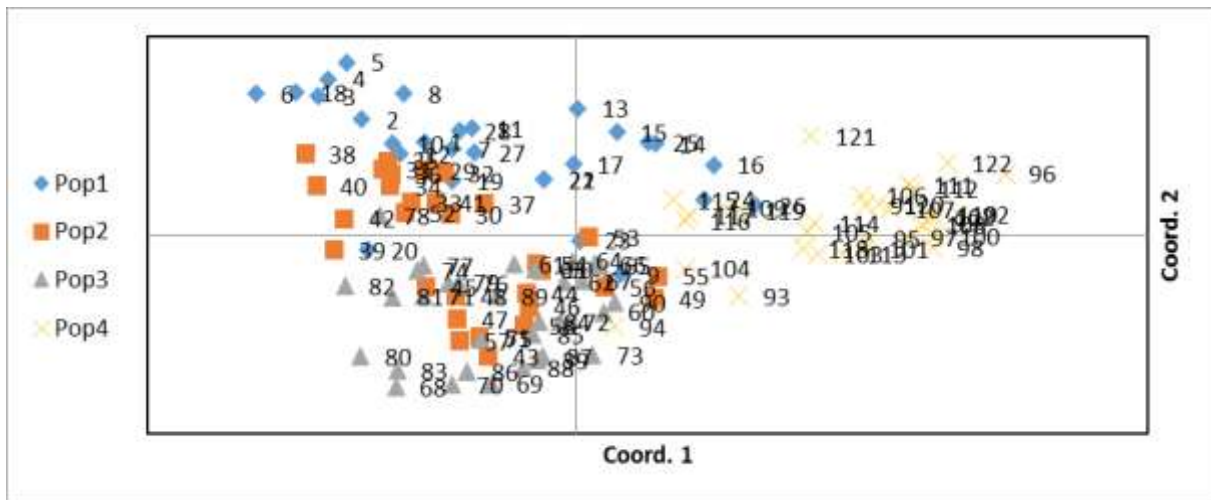
بررسی تفاوت ژنتیکی جفتی بین جمعیت‌های بررسی شده نیز نشان داد تفاوت جفتی بین جفت جمعیت‌های مختلف بر اساس Fst، رابطه معناداری را در تمام مقایسه‌های جفتی نشان می‌دهد. شاخص فاصله

جدول ۵- مقایسه جفتی جمعیت‌های مختلف بر اساس Fst (اعداد پایینی)، مقادیر Nm (مقادیر داخل پرانتز) و شاخص فاصله ژنتیکی نی (اعداد بالایی). علامت \* نشان‌دهنده سطح معناداری ۰/۰۵، \*\* نشان‌دهنده سطح معناداری ۰/۰۱ است.

ساریگل	قورخود	سالوک	گلول - سرانی	
۰/۸۴**	۰/۶۸*	۰/۷۲**		گلول - سرانی
۰/۷۶**	۰/۶۷*		(۱/۹۴)۰/۱۱**	سالوک
۰/۶۷**		(۸/۳۷)۰/۰۳*	(۲/۶۹)۰/۰۸*	قورخود
	(۴/۶۵)۰/۰۵۳**	(۱/۵۸)۰/۱۳**	(۱/۴۳)۰/۱۴**	ساریگل

مجزایی را نشان می‌دهد. جمعیت‌های قورخود و سالوک نسبت به سایر جمعیت‌ها شباهت بیشتری به هم دارند (شکل ۲).

نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان دادند جمعیت ساریگل تقریباً از جمعیت‌های دیگر جدا شده است. همچنین، جمعیت گلول - سرانی نیز جمعیت تقریباً

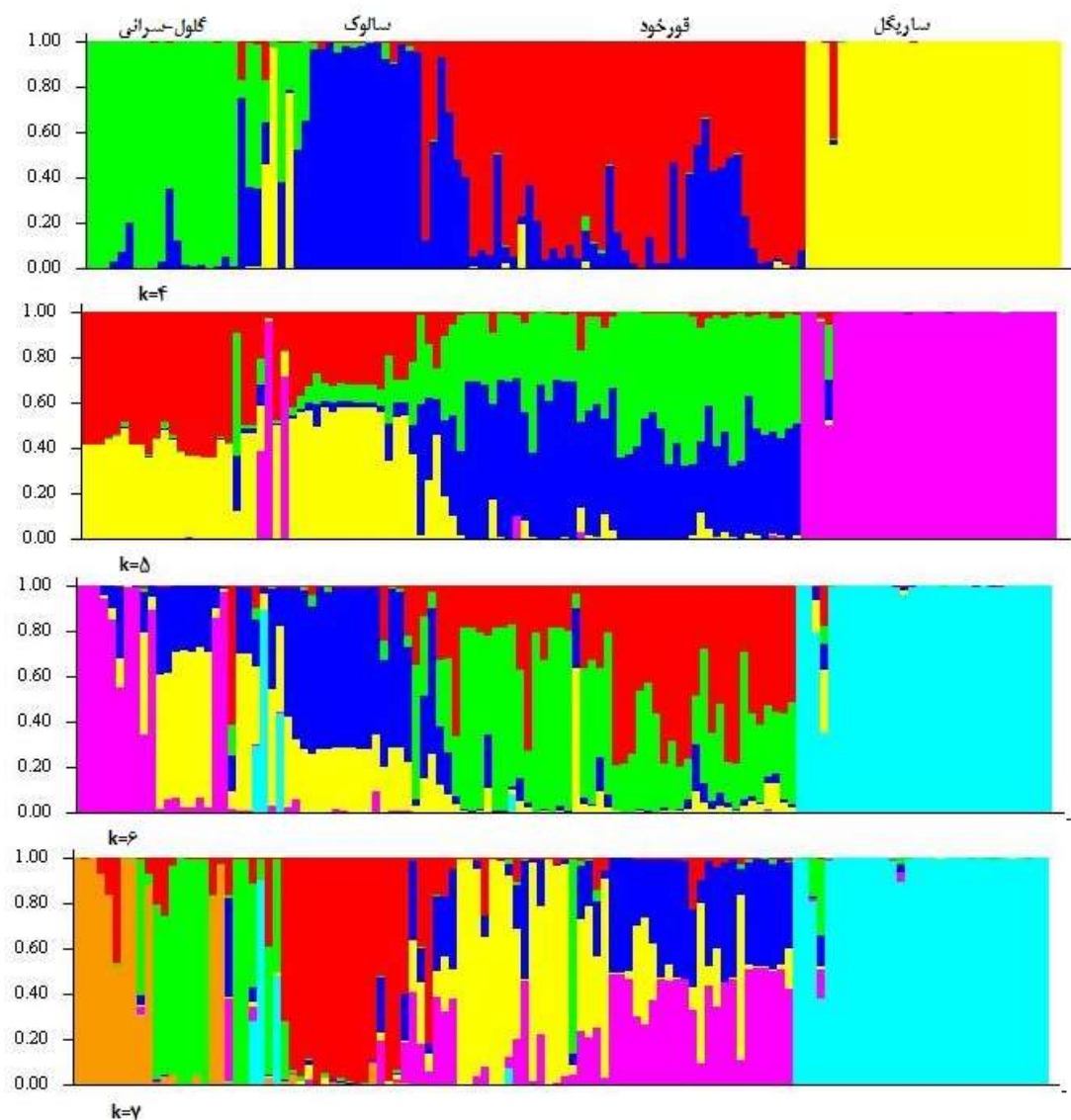


شکل ۲- نمودار حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) در نرم‌افزار GenAlex. Pop1: گلول-سرانی، Pop2: قورخود، Pop3: سالوک و Pop4: ساریگل

نتایج گروه‌بندی بر اساس الگوی پریچارد نشان دادند نمونه‌های جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر از نظر ساختار ژنتیکی تقریباً هفت گروه را تشکیل می‌دهند (جدول ۶ و شکل ۳).

جدول ۶- محاسبه میزان  $\ln P(D)$  با فرض تعلق تمام نمونه‌ها به یک جمعیت

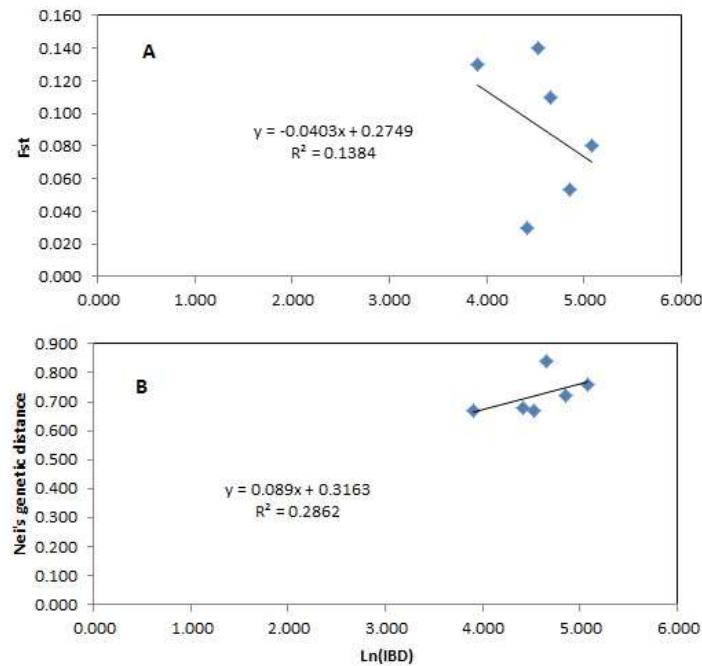
Ln probability of the data	تعداد جمعیت (K)
-۲۲۴۱/۰	۱
-۲۰۰۵/۳	۲
-۱۸۸۸/۴	۳
-۱۸۶۳/۳	۴
-۱۸۴۴/۲	۵
-۱۸۲۲/۳	۶
-۱۸۱۱/۴	۷
-۱۸۲۹/۷	۸
-۱۸۳۹/۲	۹
-۱۸۵۰/۲	۱۰



شکل ۳- گراف حاصل از نرم‌افزار STRUCTURE بر اساس  $k$  مساوی ۴ تا ۷. در این تصویر، هر فرد با میله‌ای عمودی نشان داده شده است.

همچنین بر اساس آزمون منتل (۱۰۰۰۰ تکرار)، این جدایی بین شاخص فاصله ژنتیکی نی مربوط به جمعیت‌های مختلف و فاصله جغرافیایی ( $p=۰/۱۲$ ) ( $r=۰/۵۳۵$ ) (شکل ۴B) مشاهده نشد.

نتایج وجود رابطه بین  $F_{st}$  و ماتریس فاصله اقلیدسی (IBD Matrix) بر اساس آزمون منتل نشان دادند جدایی بین جمعیت‌ها بر اثر فاصله جغرافیایی معنادار نیست (شکل ۴A) یا جدایی بر اثر فاصله رخ نداده است.



شکل ۴- نتایج آزمون متیل بین Fst و فاصله جغرافیایی (A) و فاصله ژنتیکی نی و فاصله جغرافیایی (B)

نتایج نشان دادند نسبت زیادی از افراد کل جمعیت‌ها (۹۰ درصد) به درستی به جمعیت اولیه متعلق بوده‌اند و فقط ۱۰ درصد افراد جمعیت‌ها از سایر جمعیت‌ها مهاجرت کرده‌اند. بیشترین عدم تطبیق در منطقه حفاظت‌شده قورخود و بیشترین مهاجرت افراد بین منطقه حفاظت‌شده قورخود و پارک ملی سالوک مشاهده شد (جدول ۷).

جدول ۷- نتایج آزمون تطبیقی بین جمعیت‌های مختلف و درصد درستی تطبیق در جمعیت‌ها

متعلق به خود جمعیت	متعلق به سایر جمعیت‌ها	گلول - سرانی	سالوک	قورخود	ساریگل
۲۵	۳	-	۱	-	۲
۲۷	۳	-	-	۳	-
۲۶	۶	-	۶	-	-
۳۲	-	-	-	-	-
۹۰	۱۰	-	-	-	-

### بحث و نتیجه‌گیری

وجود چنین انحراف‌هایی در برخی مناطق از نظر زیست‌شناختی توضیح‌پذیر و به نوع زندگی این جانور مربوط است. معمولاً پایکاه‌ها قدرت پراکندگی کمی دارند و پراکنش پیرامون محل زندگی، احتمال آمیزش با بستگان و آمیزش غیرتصادفی را زیاد می‌کند (Henry

نتایج تحلیل تعادل هاردی - واینبرگ در لوکوس‌ها نشان دادند تعداد لوکوس در منطقه گلول - سرانی از تعادل انحراف دارد و در پارک‌های ملی سالوک و ساریگل نیز یک لوکوس از این تعادل تبعیت نمی‌کند.

نرها تمایل دارند بیشتر از ماده‌ها پراکندگی داشته باشند و نوع سیستم جفت‌گیری به شکل هرج‌ومرج جنسی است (Zgurski and Hik, 2012). هرج‌ومرج جنسی یکی از عواملی است که مقدار درون‌آمیزی در جمعیت را کاهش می‌دهد (Vignieri, 2007). اگرچه سیستم جفت‌گیری پایکای افغانی کاملاً متغیر است و بسته به شرایط، یکی از سیستم‌های موجود را استفاده می‌کند (Macdonald, 2001)، استفاده از سیستم هرج‌ومرج جنسی در جفت‌گیری همانند بیشتر پایکاها، نقش زیادی در کاهش مقدار درون‌آمیزی آن خواهد داشت. بر اساس یافته‌ها، تنوع ژنتیکی به‌نسبت زیادی در محدوده مطالعه‌شده مشاهده می‌شود. تحلیل‌ها نشان دادند تمام لوکوس‌های استفاده‌شده چندریختی داشتند و ۶ تا ۸ آلل در کل جمعیت‌ها در هر لوکوس مشاهده شد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (۰/۶۴۸) مشابه سایر گونه‌های پایکا از جمله پایکای آمریکایی (بین ۰/۷۰۹ تا ۰/۷۳۶) بر اساس یافته‌های Peacock در سال ۱۹۹۷ و میانگین هتروزیگوسیتی (۰/۵۸۸) در پایکای آمریکایی بر اساس یافته‌های Merideth در سال ۲۰۰۵ است. این یافته‌ها نشان می‌دهند با وجود جدایی زیستگاهی، پایکاها تفاوت‌های ژنتیکی را در سطح بالایی حفظ می‌کنند (Merideth, 2005). Peacock (۱۹۹۷) نشان داد پایکاها تا دو کیلومتر بین لکه‌های زیستگاهی حرکت می‌کنند. اگر پایکاها به شکل منظم بین لکه‌های زیستگاهی مشخص حرکت کنند، نمونه‌های صیدشده جانوران یک منطقه و یا لکه زیستگاهی ممکن است منبع ژنی بزرگ‌تری مربوط به افراد همان لکه زیستگاهی و لکه‌های زیستگاهی مجاور نشان دهند؛ چنین ارتباطی ممکن است ویژگی ساختار ژنتیکی لکه‌ای باشد (Harrison, 1991). جریان ژنی

(et al., 2012) و درون‌آمیزی را افزایش می‌دهد که به انحراف از تعادل منجر می‌شود. نتایج محاسبه درون‌آمیزی در جمعیت‌های مطالعه‌شده نشان دادند مقدار درون‌آمیزی در تمام جمعیت‌ها همانند پایکای آمریکایی (در جنس نر به‌طور متوسط ۰/۴۴۸ و در جنس ماده ۰/۶۴۸) بر اساس پژوهش Robson در سال ۲۰۱۳ مثبت اما مقدار آن کم است. این مقدار بر اساس روش‌های وایر - کوکرهام و رابرتسون - هیل در مناطق حفاظت‌شده قورخود و گلول - سرانی بیشتر از دو منطقه دیگر برآورد شد و با وجود مثبت بودن مقدار آن در پارک‌های ملی سالوک و ساریگل، به جمعیت‌های دارای تولیدمثل تصادفی (نزدیک به صفر) بسیار نزدیک بود. در بیشتر گونه‌هایی که فاصله پراکندگی آنها کوتاه است، معمولاً افراد جمعیت با بستگانی زندگی می‌کنند که ممکن است جفت آنها نیز باشند (Zgurski and Hik, 2012). از سوی دیگر، ممکن است در جمعیت‌های پستانداران کوچکی که به‌وسیله فعالیت‌های انسانی به‌شدت تکه‌تکه شده‌اند، درون‌آمیزی به‌شدت مشاهده شود (Ricanova et al., 2011). سایر پژوهش‌ها در زمینه پایکاها (Henry et al., 2012) نشان دادند پایکاها (از جمله پایکای افغانی) معمولاً قدرت پراکندگی کمی دارند و باوجود این، مقدار شاخص درون‌آمیزی در جمعیت‌های مطالعه‌شده زیاد برآورد نشد (Henry et al., 2012). تحلیل‌های ساختار ژنتیکی سایر گونه‌ها از جمله موش جهنده (*Zapus trinotatus*) با میانگین پراکندگی کم، نشان دادند لزوماً قدرت پراکندگی محدود به درون‌آمیزی زیاد منتهی نمی‌شود (Vignieri, 2007). ویژگی‌های نامشخصی در پراکندگی موش جهنده دخیل هستند که احتمال درون‌آمیزی را کاهش می‌دهند. در این گونه،

تطبیقی، تمام افراد موجود در پارک ملی ساریگل به جمعیت اصلی خود تعلق داشتند. شهر اسفراین، این دو منطقه را از هم جدا کرده و جاده ارتباطی بین بجنورد و اسفراین با تردد زیاد، عاملی برای محدود کردن جریان ژن بین این دو منطقه است؛ بنابراین، جمعیت پارک ملی ساریگل نشان داد جدایی بین جمعیت‌ها ممکن است حتی در مقیاس محلی و فاصله‌های کوتاه اتفاق بیفتد. پژوهش‌های مربوط به پایکای آمریکایی (*Ochotona princeps*) نیز نشان دادند چنین جدایی در فاصله‌های کوتاه امکان‌پذیر است (Merideth, 2005). گروه‌بندی جمعیت‌ها بر اساس روش PCA و ترسیم درخت تبارشناختی مشخص کرد جمعیت‌های پارک ملی ساریگل و منطقه حفاظت‌شده گلول-سرانی ارتباط کمتری با سایر جمعیت‌ها دارند، ولی دو جمعیت سالوک و قورخود ارتباط ژنتیکی و جریان ژنی بسیاری با یکدیگر دارند. به نظر می‌رسد مسافت زیاد بین منطقه حفاظت‌شده گلول - سرانی و سه منطقه دیگر و قدرت پراکندگی کم پایکا، علت جریان ژنی کم بین آنها باشد، ولی ممکن است نبود چنین موانع انسان‌ساختی بین قورخود و سالوک که هر دو در سمت شرق قرار دارند، تبادل ژنی را افزایش داده باشد. نتایج آزمون تطبیقی نیز نتایج یادشده را تأیید می‌کنند. نتایج گروه‌بندی بر اساس نرم‌افزار STRUCTURE نشان دادند هفت زیرجمعیت مشخص در مناطق مطالعه‌شده پیش‌بینی می‌شوند؛ به عبارتی، چنانچه میزان K را ۴ در نظر بگیریم، جمعیت‌های مطالعه‌شده از نظر ساختار ژنتیکی به چهار گروه جداگانه تعلق دارند و هرچه میزان K به ۷ نزدیک‌تر شود، نمونه‌های حدواسط زیادی بین جمعیت‌ها مشاهده می‌شوند. نتایج گراف استخراجی از نرم‌افزار نشان دادند با هر میزان عددی K،

زیاد میان لکه‌های زیستگاهی بر مناطق دارای مقیاس محلی تأثیر می‌گذارد و افزایش تنوع ژنتیکی را باعث می‌شود. بر اساس یافته‌های He و همکاران (۲۰۰۶) و مطابق رابطه  $N_m \approx (1 / F_{ST} - 1) / 4$ ، وقتی مقدار  $N_m$  از ۰/۵ بیشتر و یا میزان  $F_{ST}$  از ۰/۳۳ کمتر باشد، جریان ژن رویکرد اصلی بین جمعیت‌ها در نظر گرفته می‌شود و برعکس، اگر میزان جریان ژن  $N_m$  از ۰/۵ کمتر و میزان تفاوت ژنتیکی  $F_{ST}$  از ۰/۳۳ بیشتر باشد، وجود ساختار ژنتیکی متفاوت مهم‌ترین عامل تفکیک جمعیت‌هاست (He et al., 2006). با توجه به کم‌تر بودن میزان تفاوت ژنتیکی کلی  $F_{ST}$  از ۰/۳۳ و بیشتر بودن مقدار جریان ژن  $N_m$  از ۰/۵ در مطالعه حاضر، تبادل ژنی بین زیستگاه‌ها زیاد و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها کم است. اگرچه مقادیر تفاوت ژنتیکی ( $F_{ST}$  و  $R_{ST}$ ) بین جمعیت‌ها کم است، تمام مقایسه‌های جفتی معنادار و نشانه‌ای از تفاوت ژنتیکی هرچند اندک بین جمعیت‌های مطالعه‌شده هستند. نتایج تحلیل AMOVA نشان دادند تفاوت معناداری بر اساس مقادیر  $F_{ST}$  و  $R_{ST}$  بین جمعیت‌ها وجود دارد. همچنین واریانس توجیهی (بر اساس  $F_{ST}$  برابر ۹۰/۵۱ درصد و  $R_{ST}$  برابر ۶۹/۳۶) به درون جمعیت‌ها تعلق دارد (جدول ۴) که تنوع ژنتیکی کم بین جمعیت‌ها را نشان می‌دهد و نتایج مقایسه‌های جفتی را تأیید می‌کند. تنوع ژنتیکی جمعیتی زیاد همراه با جریان ژن درخور توجه بین زیستگاه‌های لکه‌ای نشان می‌دهد پراکندگی (Dispersal) عامل اصلی و تأثیرگذار در پویایی جمعیت‌های مطالعه‌شده است (Merideth, 2005). مقادیر  $F_{ST}$  و  $R_{ST}$  بین پارک‌های ملی سالوک و ساریگل با وجود نزدیکی آنها به یکدیگر، بیش از حد انتظار بودند. آزمون تطبیقی نیز چنین جدایی آشکاری را تأیید کرد. بر اساس آزمون

به نظر می‌رسد کوچکی مقیاس مطالعه‌شده بر تأثیرگذاری فاصله در جریان ژن مؤثر بوده است. گروه‌بندی نمونه‌ها در STRUCTURE، وجود هفت زیرجمعیت را در چهار منطقه بررسی شده تأیید کرد. نتایج تحلیل‌های ریزماهواره نیز نشان دادند جمعیت‌های ساریگل و گلول - سرانی ارتباط کمتری با سایر مناطق دارند و جریان ژن بیشتری بین دو جمعیت سالوک و قورخود برقرار است. به نظر می‌رسد جریان ژنی کم بین منطقه حفاظت‌شده گلول - سرانی و سه منطقه دیگر به علت مسافت زیاد بین آنها و قدرت پراکندگی کم پایکا باشد. ممکن است موانع انسان‌ساخت از جمله شهر اسفراین بین این مناطق و جاده اصلی بجنورد - اسفراین علت نبود تبادل ژنتیکی زیاد بین دو منطقه نزدیک به هم سالوک و ساریگل باشد و شاید نبود چنین موانع انسان‌ساختی بین قورخود و سالوک که هر دو در سمت شرق قرار دارند، تبادل ژنی را افزایش داده باشد.

منطقه ساریگل تقریباً یک جمعیت را نشان می‌دهد و ارتباط کمتری با سایر جمعیت‌ها دارد. در مناطق قورخود، گلول - سرانی و سالوک گروه‌های حدواسط بیشتری مشاهده می‌شوند.

### جمع‌بندی نتایج ساختار ژنتیکی

نتایج تحلیل AMOVA، وجود ساختار ژنتیکی معناداری بین جمعیت‌های مختلف بررسی شده نشان می‌دهند. در همه ژن‌های مطالعه‌شده، بیشتر واریانس توجیهی به واریانس درون جمعیت‌ها مربوط است. به نظر می‌رسد ساختار ژنتیکی مختلف هرچند اندک بین جمعیت‌های مطالعه‌شده وجود دارد. بر اساس مطالعه‌های IBD، رابطه معناداری بین فاصله جغرافیایی و میزان جریان ژن (در این مطالعه از  $F_{ST}$  به این منظور استفاده شد) وجود ندارد که تأثیرنداشتن فاصله بین جمعیت‌ها بر میزان جریان ژن پایکای افغانی را نشان می‌دهد، هرچند

### منابع

- Aghamiri, S. H., Golestani, H., Bijhani, M. and Ahdokhshi, R. (2003) The Sarigol protected area and National park, DOE, Iran (in Persian).
- Khosravi sharaf abadi, R. (2011) Detecting hybridization between Iranian Wild Wolf (*Canis Lupus Pallipes*) and Free-Ranging Domestic Dog (*Canis Familiaris*) by Analysis of Microsatellite Markers in connection with recent wolf or dogs attacks on humans. MSc thesis, University of Tehran, Tehran, Iran (in persian).
- Bailie, J., Taylor, C. and Stuart, S. (2004) IUCN Red List of Threatened Species. IUCN Publication Services Unit, Cambridge, UK.
- Castillo, J. A., Epps, C. W., Davis, A. R. and Cushman S. A. (2014) Landscape effects on gene flow for a climate-sensitive montane species, the American Pika. *Molecular Ecology* 23: 843-856.
- Frankham, R. (2005) Genetics and Extinction. *Biological Conservation* 126: 131-140.
- Harrison, S. (1991) Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation. *Biological Journal of the Linnean Society* 42: 73-88.
- He, H., Yuan, X., Wei, C. and Yuan, F. (2006) Genetic variation of the mitochondrial ND4 region among geographical populations of *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) in China. *Journal of the Kansas Entomological Society* 79(3): 211-222.
- Hedrick, P. W. (2000) Genetics of populations. 2nd ed. Jones and Bartlett. Sudbury (MA).

- Henry, P., Sim, Z. J. and Russello, M. A. (2012) Genetic evidence for restricted dispersal along continuous altitudinal gradients in a climate change-sensitive mammal: the American Pika. *PLOS ONE* 7: e39077.
- Lanier, H. C. and Olson, L. E. (2012) Deep barriers, shallow divergences: reduced phylogeographical structure in the collared Pika (Mammalia: Lagomorpha: *Ochotona collaris*). *Journal of Biogeography* 40: 466-478.
- Lin, G., Ci, H., Thirgood, S. J., Zhang, T. and Su, J. (2010) Genetic variation and molecular evolution of endangered Kozlov's Pika (*Ochotona koslowi buchner*) based on mitochondrial cytochrome b gene. *Polish Journal of Ecology* 58: 563-568.
- Lissovsky, A. A. (2014) Taxonomic revision of Pikas *Ochotona* (Lagomorpha, Mammalia) at the species level. *Mammalia* 78(2): 199-216.
- Macdonald, D. (2001) *The new encyclopedia of Mammals*, Oxford University Press, England.
- Merideth, S. J. (2005) The impact of habitat spatial structure on Pika (*Ochotona princeps*) dispersal dynamics. MSc thesis, University of Nevada, Reno, USA.
- Peacock, M. M. (1997) Determining natal dispersal patterns in a population of North American pikas (*Ochotona princeps*) using direct mark-resight and indirect genetic methods. *Behavioral Ecology* 8: 340-350.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. (2012) GenAlex 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Randi, E., Davoli, F., Pierpaoli, M., Pertoldi, C., Madsen, A. B. and Loeschke, V. (2003) Genetic structure in otter (*Lutra lutra*) populations in Europe: implications for conservation. *Animal Conservation* 6: 93-100.
- Ricanova, S., Bryja, J., Cosson, J-F., Csongor, G., Choleva, L., Ambros, M., Sedlacek, F. (2011) Depleted genetic variation of the European ground squirrel in Central Europe in both microsatellites and the major histocompatibility complex gene: implications for conservation. *Conservation Genetics* 12: 1115-1129.
- Robson, K. M. (2013) American Pika population genetic structure, Demographic history and behavior in an atypical environment. MSc thesis, The University of British Columbia, Okanagan, Canada.
- Rousset, F. (2008) GENEPOP 4. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Segelbacher, G., Høglund, J. and Storch, I. (2003) From connectivity to isolation: genetic consequences of population fragmentation in capercaillie across Europe. *Molecular Ecology* 12: 1773-1780.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. and Shipley, P. (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Vignieri, S. N. (2007) Streams over mountains: influence of riparian connectivity on gene flow in the Pacific jumping mouse (*Zapus trinotatus*). *Molecular Ecology* 14: 1925-1937.
- Zgurski, J. M. and Hik, D. S. (2012) Polygynandry and even-sexed dispersal in a population of collared Pikas, *Ochotona collaris*. *Animal Behavior* 83: 1075-1082.
- Zgurski, J. M., Davis, C. S. and Hik, D. S. (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci for the collared pika (*Ochotona collaris*) and their cross amplification in five other *Ochotona* species. *Permanent Genetic Resource Note* 867-871.





## Genetic structure of Afghan Pika (*Ochotona rufescens*) in Northern Khorasan Province

Olyagholi Khalilipour<sup>1\*</sup>, Afshin Alizadeh Shabani<sup>2</sup>, Hamid Reza Rezaei<sup>3</sup>, Mohammad Kaboli<sup>4</sup>,  
Sohrab Ashrafi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Environmental Sciences, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Iran.

<sup>2</sup> Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>3</sup> Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>4</sup> Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>5</sup> Department of Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

### Abstract

The aim of this research was to study the genetic structure of the Afghan Pika's (*Ochotona rufescens*) populations in Northern Khorasan province in order to determine their isolation rate. A total of 122 samples from four sample groups (Ghorkhod, Golol-Sarani, Salouk and Sarigol) were selected and the genotypic features were detected using 7 microsatellite loci. The results showed that all of the loci were subject to polymorphism and the allele ranged from 2 – 7. Significant  $F_{st}$  and  $R_{st}$  values were found among the populations based on the AMOVA test. Based on the Assignment Test, more than 90 percent of the individuals of the populations belonged to their original population (only 10 percent of the individuals belonged to other populations). A Paired comparison of genetic differentiation between the populations revealed significant differences among them. The results of the Prichard model grouping showed that the samples collected in this study were approximately 7 groups. The results of AMOVA analysis revealed a significant genetic structure among different populations. Also, the majority of the variance is related to the variance within the population. There seems to be a different but small genetic structure among the studied populations.

**Key words:** Afghan Pika, *Ochotona rufescens*, Microsatellite loci,  $F_{st}$ ,  $R_{st}$ , Assignment test and AMOVA.

\* o.khalilipour@kmsu.ac.ir

## ساختار ژنتیکی جمعیت‌های پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*) در استان خراسان شمالی

اولیاقلی خلیلی پور<sup>۱\*</sup>، افشین علیزاده شهپانی<sup>۲</sup>، حمیدرضا رضایی<sup>۳</sup>، محمد کابلی<sup>۴</sup>، سهراب اشرفی<sup>۵</sup>  
<sup>۱</sup> استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر ایران  
<sup>۲</sup> استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران  
<sup>۳</sup> استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ایران  
<sup>۴</sup> دانشیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران  
<sup>۵</sup> استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

### چکیده

هدف مطالعه حاضر، بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*) در خراسان شمالی برای دستیابی به میزان جدایی جمعیت‌های آن است. ۱۲۲ نمونه متعلق به چهار جمعیت پایکای افغانی (قورخود، گلول - سرانی، سالوک و ساریگل) صید و ویژگی‌های ژنوتیپی آنها با استفاده از هفت نشانگر ریزماهواره بررسی شدند. نتایج نشان دادند تمام لوکوس‌های مطالعه شده چندریختی دارند و تعداد آلل‌ها در این جایگاه‌ها بین دو تا هفت آلل متغیر است. بر اساس روش تحلیل واریانس مولکولی،  $F_{st}$  و  $R_{st}$  معناداری بین جمعیت‌های بررسی شده وجود دارد. نتایج آزمون تطبیقی نشان دادند نسبت زیادی از افراد کل جمعیت‌ها (۹۰ درصد) به درستی به جمعیت اولیه متعلق بودند و فقط ۱۰ درصد افراد جمعیت‌ها از سایر جمعیت‌ها مهاجرت کرده‌اند. بررسی تفاوت ژنتیکی جفتی بین جمعیت‌های بررسی شده نیز نشان داد تفاوت جفتی بین جفت جمعیت‌های مختلف بر اساس  $F_{st}$ ، رابطه معناداری در تمام مقایسه‌های جفتی نشان می‌دهد. نتایج گروه‌بندی الگوی پریچارد نیز نشان دادند نمونه‌های جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر تقریباً هفت گروه تشکیل می‌دهند. نتایج تحلیل AMOVA، وجود ساختار ژنتیکی معناداری بین جمعیت‌های مختلف بررسی شده نشان دادند و بیشتر واریانس به واریانس درون جمعیت‌ها مربوط بود. به نظر می‌رسد ساختار ژنتیکی مختلف هرچند اندک بین جمعیت‌های مطالعه شده وجود دارد.

**واژه‌های کلیدی:** پایکای افغانی، *Ochotona rufescens*، نشانگرهای ریزماهواره،  $F_{st}$ ،  $R_{st}$ ، آزمون تطبیقی و AMOVA.

\* o.khalilipour@kmsu.ac.ir

## مقدمه

تغییر و نابودی زیستگاه‌ها، خطرناک‌ترین عامل برای بقای بسیاری از گونه‌های گیاهی و جانوری به شمار می‌آید (Bailie *et al.*, 2004). گونه‌هایی که در حال حاضر با چنین خطری روبه‌رو هستند، بیشتر به جمعیت‌های کوچک و جداافتاده محدود شده‌اند و معمولاً جریان ژن بین آنها به شدت کاهش یافته است (Segelbacher *et al.*, 2003; Randi *et al.*, 2003). به‌مرور زمان، چنین جمعیت‌های کوچک و جداافتاده‌ای تنوع ژنتیکی خود را از دست می‌دهند و ممکن است با انقراض محلی روبه‌رو شوند (Frankham, 2005). عواملی که جریان ژن و سازگاری محلی را در این جمعیت‌ها کنترل می‌کنند، نامشخص و بسیاری از پرسش‌های مربوط به روابط الگوهای سیمای سرزمین و ساختار ژنتیکی، بی‌پاسخ هستند؛ باوجوداین، پاسخ به چنین پرسش‌هایی برای مدیریت مطلوب جمعیت‌های جانوری و گیاهی امری حیاتی است. استفاده از مباحث ژنتیکی، یکی از روش‌هایی است که به موضوع یادشده می‌پردازد و روش‌های مولکولی بسیاری برای پی‌بردن به وضعیت گونه‌ای از نظر ژنتیکی توسعه یافته‌اند (Lin *et al.*, 2010). سیتوکروم ب و *ND4* از ژن‌های میتوکندری و همچنین ریزماهوره‌ها بیشتر از سایر ژن‌ها برای پی‌بردن به ساختار ژنتیکی پایکاها استفاده شده‌اند. نتایج مطالعه‌ها بر اساس ژن‌های یادشده نشان می‌دهند معمولاً تغییرات ژنتیکی درون جمعیت پایکاها نسبت به بین جمعیت‌ها بیشتر است، هرچند با افزایش وسعت منطقه مطالعه در سطح کلان، تفاوت تغییرات ژنتیکی بین جمعیت‌ها نسبت به درون جمعیت‌ها بیشتر می‌شود. در برخی پایکاها، ساختار ژنتیکی معناداری در شیب ارتفاعی و شیب عرض جغرافیایی مشاهده می‌شود.

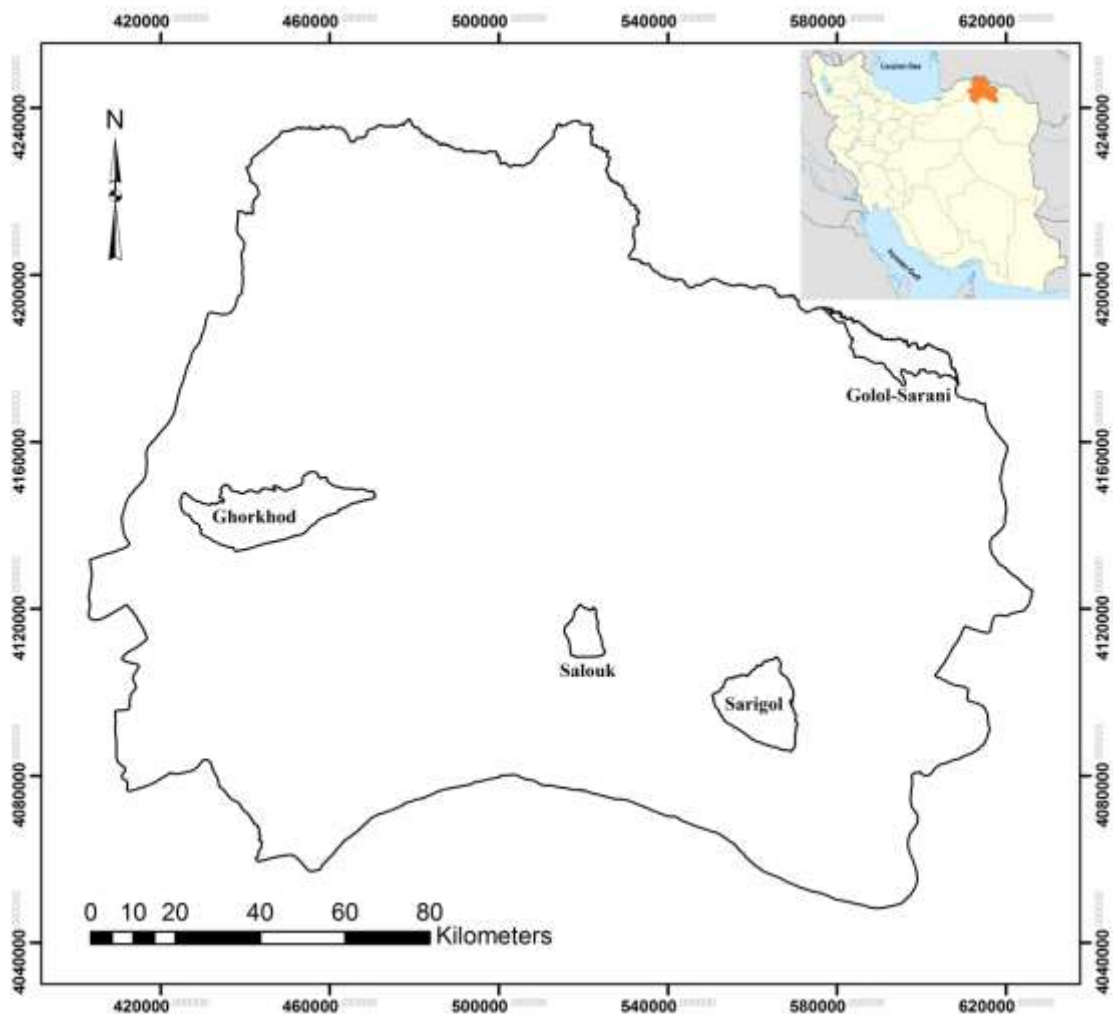
پایکاهای جوان، پراکندگی محدودی در حدود ۳۰۰ متر از محل تولد خود دارند و این فاصله در پایکاهای بالغ به ۶۰۰ متر می‌رسد. همچنین با وجود پدیده گردن‌بطری، جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی خود را حفظ می‌کنند که احتمالاً به علت مهاجرت معدودی از افراد سایر جمعیت‌ها به داخل هر جمعیت است. معمولاً گسترش سریع کنونی در جمعیت پایکاها مشاهده می‌شود. از آنجا که ریزماهوره‌ها از راه کروموزوم‌های غیرجنسی هر دو جنس به فرزندان منتقل می‌شوند، هر فرد نسخه‌ای از آن را از مادر و نسخه‌ای را از پدر به ارث می‌برد. تنوع زیاد، زیادبودن میزان جهش، چندریختی زیاد در این نشانگرها به دلیل تفاوت طول آنها و در نتیجه تفاوت نوع آلل‌ها سبب شده‌اند ریزماهوره‌ها کاربرد وسیعی در مطالعه‌های جمعیتی داشته باشند. مطالعه‌های Castillo و همکاران (۲۰۱۴) بر اساس سیتوکروم ب و ریزماهوره‌ها، مطالعه‌های Lisovsky و همکاران (۲۰۱۴) و Olson و Lanier (۲۰۱۲) بر اساس ژن‌های میتوکندری از جمله مطالعه‌ها در این زمینه هستند. در پژوهش حاضر، ساختار ژنتیکی جمعیت‌های پایکای افغانی (*Ochotona rufescens*) در خراسان شمالی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره بررسی شد تا میزان جدایی بین جمعیت‌ها برآورد شود.

## مواد و روش‌ها

### منطقه مطالعه‌شده

محدوده مطالعه‌شده دربرگیرنده چهار منطقه در گستره گیتاشناختی استان خراسان شمالی است. این استان از نظر ناهمواری‌ها به دو بخش نواحی کوهستانی و نواحی پست و هموار تقسیم می‌شود و مرتفع‌ترین نقطه آن، قله شاه جهان در رشته‌کوه‌های

آلاداغ، ۳۰۵۱ متر ارتفاع دارد. ارتفاع متوسط استان، ۱۳۲۶ متر از سطح دریاست. چهار منطقه مطالعه شده در این استان عبارتند از: پارک ملی و منطقه حفاظت شده ساریگل؛ پارک ملی سالوک؛ منطقه حفاظت شده قورخود؛ منطقه حفاظت شده گلول - سرانی (شکل ۱).



شکل ۱- موقعیت مکانی مناطق مطالعه شده در استان خراسان شمالی

که در پژوهش‌های پیشین درباره گونه‌های دیگر پایکا استفاده شده بودند (Zgurski *et al.*, 2008).

### روش اجرای پژوهش

استخراج DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت ویژه استخراج DNA از بافت، ساخت شرکت بیونیر انجام شد. از هفت آغازگر ریزماهواره (جدول ۱) استفاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در پژوهش حاضر

نام نشانگر	توالی آغازگر	شماره ثبت شده در بانک ژن	تعداد چرخه	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)
Ocp1	F: AGTGACATAAAATGACGGGACA R: TCAGACCCAACACTCAACACAG	AF487492	۳۵	۵۵
Ocp3	F: CAGCCATCTGGACAATGAAACTAA R: GGAACATTTGCCGTTGTAGAAAG	AF487494	۳۵	۵۵
Ocp4	F: CACTAGGTTATTGCGCCAGGGT R: CTGCTTCTGGTTTCAGCCTGACT	AF487495	۳۵	۵۹
Ocp5	F: CAAGTTCGGCTTTGCTCAGTTC R: GTACATGCAGTGGCAAGGGTTGA	AF487496	۳۵	۵۵
Ocp6	F: GGCTTCAGATTTCTCAACACC R: CCACCTGACTTCTGCAACTTCT	AF487497	۳۵	۵۵
Ocp7	F: ATCCTGAGCTATCTTTGCCATT R: CCCAAAACCTCTTGAGAGACA	AF487498	۳۵	۵۵
Ocp8	F: TTCTCTGGAGTCCTCTAACCC R: CCTCGAGCAAGTTTGGTTGTT	AF487499	۳۵	۵۹

رنگ آمیزی شدند و برای شناسایی اندازه باندها از نرم افزار Gel analyzer 2010 استفاده شد.

### تحلیل داده‌ها

در مطالعه حاضر، از نرم افزار GenAlex نسخه ۶/۵ (Peakall and Smouse, 2012) برای تعیین تعادل هاردی- واینبرگ استفاده شد که بر اساس روش Hedrick (۲۰۰۰) و با استفاده از آزمون کای-اسکویر انجام می شود. از نرم افزار MicroCheker نسخه ۲/۲/۳ (Van Oosterhout *et al.*, 2004) برای بررسی وجود داشتن آلل نول بین آلل های هر لوکوس استفاده شد. بررسی ناپیوستگی ژنوتیپی (Linkage disequilibrium) با نرم افزار Arlequin نسخه ۳/۵ (Excoffier and Lischer, 2000) انجام شد. فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و وجود آلل های اختصاصی برای هر یک از نشانگرهای مطالعه شده در هر یک از جمعیت ها و کل جمعیت ها با استفاده از نرم افزار GENETOP نسخه ۴ (Rousset, 2008) محاسبه شد.

پس از انتخاب نشانگرهای مدنظر، واکنش PCR برای هر یک از آغازگرهای ریزماهواره انجام شد. به این منظور، برای تکثیر توالی های مدنظر از Master Mix های ساخت شرکت سیناژن با حجم ۱۲ میکرولیتر استفاده شد. برنامه حرارتی چرخه PCR با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره به شرح زیر بود: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه؛ واسرشت سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۳۵ دور؛ اتصال آغازگرها در دمای بین ۵۵ تا ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ گسترش زنجیره در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۵ ثانیه؛ گسترش نهایی زنجیره در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. پس از تکثیر توالی های مدنظر، محصول PCR به مدت ۴ ساعت با ولتاژ ۱۶۰ ولت در دستگاه الکتروفورز عمودی ساخت شرکت بیونیر با ابعاد ۲۰×۲۰ سانتی متر و ژل آکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز محصول PCR، ژل ها به روش نترات نقره

اساس ژنوتیپ خود ممکن است به یک گروه تعلق داشته باشد. همان‌طور که گفته شد تبعیت لوسی‌ها از تعادل هاردی - واینبرگ و ترکیب تصادفی آلل‌ها در لوسی‌های مختلف، دو فرض اساسی و مهم در استفاده از الگوی پریچارد هستند. در مطالعه حاضر، از الگوی ترکیبی یا اختلاطی در نرم‌افزار Structure استفاده شد. فرض روش این بود که هیچ اطلاعاتی از پیش درباره تعداد جمعیت نمونه‌ها وجود ندارد و گروه‌بندی نمونه‌ها در این الگو بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی انجام نشد. تعداد مناسب K برای این داده‌ها با قراردادن K بین ۱ تا ۱۰ ( $MAXPOPS=1-10$ ) و محاسبه احتمال بیشینه داده‌ها ( $Ln P(D)$ ) محاسبه شد. چنانچه نمونه‌های مطالعه‌شده بیش از یک جمعیت را تشکیل دهند، انتظار می‌رود احتمال بیشینه داده‌ها با افزایش میزان K افزایش یابد (Pritchard *et al.*, 2000). محاسبه میزان فاصله ژنتیکی یکی از راه‌های بررسی میزان واگرایی ژنتیکی و تکاملی میان جمعیت‌ها و یا افراد مختلف است. برای رسم درخت تبارشناسی، ابتدا میزان فاصله ژنتیکی بین افراد با استفاده از نرم‌افزار Population نسخه ۲/۳/۲ محاسبه شد. در مطالعه حاضر، از شاخص کاوالی - سفروزا (Dc) برای محاسبه فاصله ژنتیکی بین افراد استفاده شد. پس از تشکیل ماتریس فاصله ژنتیکی بین افراد، درخت تبارشناسی بین جمعیت‌ها بر اساس الگوریتم اتصال همسایگی در نرم‌افزار Mega نسخه ۵/۲ رسم شد. هدف از رسم این نمودار، بررسی میزان واگرایی جمعیت‌ها و گروه‌بندی نمونه‌ها بود. برای بررسی وجود داشتن یا نداشتن رابطه بین ماتریس فاصله ژنتیکی و ماتریس فاصله اقلیدوسی از آزمون متل و نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶/۵ استفاده شد. نرم‌افزار یادشده برای محاسبه آزمون تطبیقی نیز استفاده شد.

شاخص  $F_{IS}$  میزان درون‌آمیزی هر یک از جمعیت‌های مطالعه‌شده و میزان هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر، میزان درون‌آمیزی برای هر نشانگر در هر جمعیت با استفاده از روش وایر - کوکرهام محاسبه و برآوردی کلی از این شاخص بر اساس تمام لوکوس‌ها با استفاده از روش وایر - کوکرهام و رابرتسون - هیل با استفاده از نرم‌افزار GENEPop انجام شد (خسروی، ۱۳۹۰). آزمون تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA)، یکی از روش‌های بررسی ساختار ژنتیکی و میزان واگرایی جمعیت‌ها از یکدیگر است. در مطالعه حاضر، از نرم‌افزار Arlequin نسخه ۳/۵ برای اجرای آزمون تحلیل واریانس مولکولی و بررسی میزان تفاوت در ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مطالعه‌شده استفاده شد. یکی از روش‌های گروه‌بندی جمعیت‌ها، استفاده از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای داده‌های ژنتیکی است؛ این روش در نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶/۵ (Peakall and Smouse, 2012) اجرا و ابتدا فاصله ژنتیکی جفت افراد بر اساس تمام نمونه‌ها محاسبه و سپس، گروه‌بندی نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار انجام شد. یکی دیگر از راه‌های بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، ارزیابی تفاوت لوسی‌های متعدد به دلیل تفاوت در فراوانی آلل‌ها و بروز لوسی‌هایی با طول‌های مختلف است. بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای ریزماهواره به ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها پی برده می‌شود. Pritchard و همکاران (۲۰۰۰) برای نخستین بار این الگو را معرفی کردند که در نرم‌افزار Structure اجرا می‌شود (خسروی، ۱۳۹۰). در این روش، فرض بر این است که نمونه‌های مدنظر، K گروه مستقل از نظر ژنتیکی تشکیل می‌دهند و هر نمونه بر

## نتایج

در مطالعه حاضر، ژنوتیپ ۱۲۲ نمونه متعلق به چهار جمعیت پایکای افغانی با استفاده از هفت نشانگر ریزماهواره تعیین شد و آلل‌های هر فرد برای هر نشانگر مشخص شدند. تمام لوکوس‌های مطالعه شده، چندریختی نشان دادند و تعداد آلل‌ها در این لوکوس‌ها بین دو تا هفت آلل متغیر بود (جدول ۲). تعداد آلل‌های اختصاصی در منطقه حفاظت شده قورخود، سه آلل؛ منطقه حفاظت شده گلول - سرانی، سه آلل؛ پارک ملی سالوک، سه آلل و پارک ملی ساریگل، چهار آلل بود (جدول ۲). بیشترین میزان آلل‌های اختصاصی در نشانگرهای Ocp4 و Ocp8 مشاهده شدند. نتایج بررسی تبعیت لوکوس‌ها از تعادل هاردی - واینبرگ نشان دادند تمام نشانگرها در سه منطقه ساریگل، سالوک و قورخود از تعادل هاردی - واینبرگ تبعیت می‌کنند و فقط دو نشانگر در منطقه حفاظت شده گلول - سرانی در تعادل هستند. نشانگرهای Ocp3، Ocp4، Ocp7 و

Ocp8 در منطقه حفاظت شده گلول - سرانی، نشانگر Ocp6 در پارک ملی سالوک و فقط نشانگر Ocp3 در پارک ملی ساریگل از تعادل هاردی - واینبرگ انحراف داشتند. نتایج آزمون کلی درباره هر نشانگر در کل نمونه‌ها نیز مشخص کردند بجز Ocp3 و Ocp7، سایر نشانگرها از تعادل هاردی - واینبرگ انحراف دارند. نتایج بررسی ترکیب آلل‌ها نشان دادند در سه منطقه گلول - سرانی، سالوک و ساریگل، پیوستگی ژنوتیپی میان لوکوس‌ها در بیشتر موارد وجود ندارد و ترکیب آلل‌ها در هر نشانگر، تصادفی و مستقل از لوکوس‌های دیگر است. تعداد پیوستگی ژنتیکی در منطقه حفاظت شده قورخود تقریباً زیاد (۸ نمونه از ۲۱ نمونه مقایسه جفتی) بود و به عبارتی، فرض ناپیوستگی ژنوتیپی در سه منطقه گلول - سرانی، سالوک و ساریگل بین لوکوس‌ها پذیرفته می‌شود ( $p > 0/05$ ). همچنین، آلل نول فقط در دو نمونه مشاهده شد که به مناطق ساریگل و گلول - سرانی مربوط بودند.

جدول ۲- نتایج بررسی وضعیت ژنتیکی در مناطق مطالعه شده بر اساس نشانگرهای ریزماهواره

نام نشانگر	سالوک	ساریگل	گلول - سرانی	قورخود	کل
Ocp1	تعداد آلل	۷	-	۶	۷
	اندازه باند	-	۳۳۸-۲۹۴	۳۳۸-۲۹۴	۳۳۸-۲۹۴
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	-	۰/۸۴۹	۰/۸۰۲	۰/۸۲۵
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	-	۰/۷۱۸	۰/۷۰۰	۰/۷۰۹
Ocp3	تعداد آلل	۷	۷	۷	۸
	اندازه باند	۳۳۸-۲۷۴	۲۳۸-۱۷۴	۳۳۱-۲۷۴	۳۳۸-۱۷۴
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۷۱	۰/۷۷۹	۰/۸۴۵	۰/۷۹۵
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۸۳۳	۱/۰۰	۰/۹۵۶	۰/۹۰۵
Ocp4	تعداد آلل	۴	۳	۶	۸
	اندازه باند	۲۹۰-۲۰۶	۳۳۸-۲۷۴	۳۳۳-۱۹۴	۳۳۳-۱۹۴
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۶۵۶	۰/۴۴۱	۰/۷۶۶	۰/۵۷۸
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۵۹۲	۰/۳۲۲	۰/۸۴۰	۰/۵۲۱



نام نشانگر	سالوک	ساریگل	گلول - سرانی	قورخود	کل
Ocp5	تعداد آلل	۵	۲	۲	۷
	اندازه باند	۲۳۵-۲۱۱	۲۳۵-۲۰۵	۲۱۱-۲۰۵	۲۲۹-۲۱۱
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۸۱	۰/۵۰۸	۰/۲۸۳	۰/۷۱۸
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۷۹۱	۰/۳۴۴	۰/۱۶۶	۰/۵۷۱
Ocp6	تعداد آلل	۴	۵	۶	۵
	اندازه باند	۳۸۴-۳۴۷	۴۰۰-۳۳۵	۴۰۰-۳۳۵	۴۰۰-۳۴۷
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۶۴۸	۰/۷۰۰	۰/۷۹۰	۰/۷۵۷
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۴۶۴	۰/۴۷۸	۰/۸۲۶	۰/۶۴۰
Ocp7	تعداد آلل	۵	۴	۴	۶
	اندازه باند	۲۹۱-۱۹۱	۲۲۹-۱۹۱	۲۲۹-۱۸۰	۲۲۹-۱۸۰
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۵۳	۰/۶۹۰	۰/۷۰۹	۰/۷۴۷
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۹۳۱	۰/۷۴۰	۰/۷۵۰	۰/۶۴۲
Ocp8	تعداد آلل	۶	۳	۳	۶
	اندازه باند	۲۵۷-۲۱۵	۲۳۰-۲۰۵	۲۳۹-۲۱۵	۲۵۷-۲۱۵
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۷۷۲	۰/۶۵۵	۰/۶۵۷	۰/۷۷۳
	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۶۷۸	۰/۸۴۳	۰/۰۷۴	۰/۶۵۵

در بین جمعیت‌های قورخود و گلول - سرانی تقریباً زیاد است و جمعیت‌های سالوک و ساریگل درون آمیزی کمی دارند (جدول ۳).

نتایج محاسبه شاخص درون آمیزی بر اساس روش‌های وایر - کوکرهام و رابرتسون - هیل نشان دادند بر اساس هر دو روش مطالعه، میزان درون آمیزی

جدول ۳- برآوردی از درون آمیزی در جمعیت‌های مطالعه شده بر اساس دو شاخص رابرتسون - هیل و وایر - کوکرهام

نشانگر	رابرتسون - هیل			وایر - کوکرهام		
	قورخود	گلول - سرانی	سالوک	ساریگل	قورخود	گلول - سرانی
Ocp1	۰/۲۲۸	-	-	۰/۱۵۱	۰/۱۲۹	-
Ocp3	-۰/۰۲۳	-۰/۱۱۳	-۰/۰۸۴	-۰/۱۵۲	-۰/۰۶۳	-۰/۱۳۴
Ocp4	۰/۲۷۱	۰/۰۰۷	۰/۰۹۰	۰/۲۶۳	۰/۲۶۵	-۰/۰۹۸
Ocp5	۰/۱۴۲	۰/۴۳۰	-۰/۰۲۵	۰/۳۳۲	۰/۲۰۸	۰/۴۱۷
Ocp6	۰/۱۲۷	-۰/۰۶۸	۰/۳۲۳	۰/۱۸۲	۰/۱۵۷	-۰/۰۴۶
Ocp7	۰/۱۲۴	-۰/۰۸۹	-۰/۱۷۲	-۰/۰۵۳	۰/۱۴۲	-۰/۰۵۷
Ocp8	۰/۲۳۰	۰/۹۰۴	۰/۰۵۴	-۰/۲۹۰	۰/۱۵۵	۰/۸۸۹
تمام نشانگرها	۰/۱۵۷	۰/۱۷۸	۰/۰۳۱	۰/۰۷۲	۰/۱۳۱	۰/۱۲۲

توزیع اندازه آللی با یکدیگر متفاوت بودند، میزان شاخص Fst بسیار کمتر از Rst بود و تفاوت دو جمعیت بیشتر بر اساس اندازه آلل هاست (جدول ۴) (خسروی، ۱۳۹۰).

بر اساس روش تحلیل واریانس مولکولی، دو شاخص محاسبه شده Fst و Rst بین جمعیت‌های بررسی شده معنادار بودند. به عبارتی، اگرچه جمعیت‌های مطالعه شده از نظر توزیع فراوانی آللی و

جدول ۴- نتایج بررسی شاخص‌های Fst و Rst با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بدون گروه‌بندی

P-value	شاخص تنبیت	درصد واریانس	
<b>تحلیل بر اساس Fst</b>			
p < ۰/۰۰۰	Fst = ۰/۰۹۴	۹/۴۹	بین جمعیت‌های مختلف
		۹۰/۵۱	درون جمعیت‌ها
<b>تحلیل بر اساس Rst</b>			
P < ۰/۰۰۰	Rst = ۰/۳۰	۳۰/۶۶	بین جمعیت‌های مختلف
		۶۹/۳۴	درون جمعیت‌ها

ژنتیکی نی (Nei's genetic distance) نیز رابطه معناداری بین تمام جفت جمعیت‌ها نشان می‌دهد. مقدار تفاوت ژنتیکی کم و جریان ژن زیاد بین جمعیت‌های مطالعه شده مشاهده می‌شود (جدول ۵).

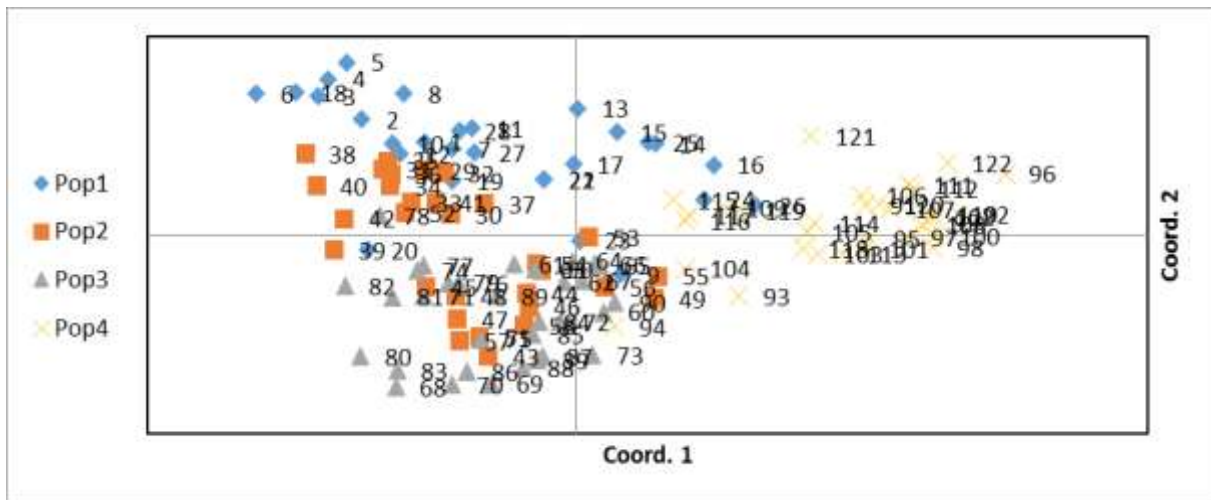
بررسی تفاوت ژنتیکی جفتی بین جمعیت‌های بررسی شده نیز نشان داد تفاوت جفتی بین جفت جمعیت‌های مختلف بر اساس Fst، رابطه معناداری را در تمام مقایسه‌های جفتی نشان می‌دهد. شاخص فاصله

جدول ۵- مقایسه جفتی جمعیت‌های مختلف بر اساس Fst (اعداد پایینی)، مقادیر Nm (مقادیر داخل پرانتز) و شاخص فاصله ژنتیکی نی (اعداد بالایی). علامت \* نشان‌دهنده سطح معناداری ۰/۰۵، \*\* نشان‌دهنده سطح معناداری ۰/۰۱ است.

ساریگل	قورخود	سالوک	گلول - سرانی	
۰/۸۴**	۰/۶۸*	۰/۷۲**		گلول - سرانی
۰/۷۶**	۰/۶۷*		(۱/۹۴)۰/۱۱**	سالوک
۰/۶۷**		(۸/۳۷)۰/۰۳*	(۲/۶۹)۰/۰۸*	قورخود
	(۴/۶۵)۰/۰۵۳**	(۱/۵۸)۰/۱۳**	(۱/۴۳)۰/۱۴**	ساریگل

مجزایی را نشان می‌دهد. جمعیت‌های قورخود و سالوک نسبت به سایر جمعیت‌ها شباهت بیشتری به هم دارند (شکل ۲).

نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان دادند جمعیت ساریگل تقریباً از جمعیت‌های دیگر جدا شده است. همچنین، جمعیت گلول - سرانی نیز جمعیت تقریباً

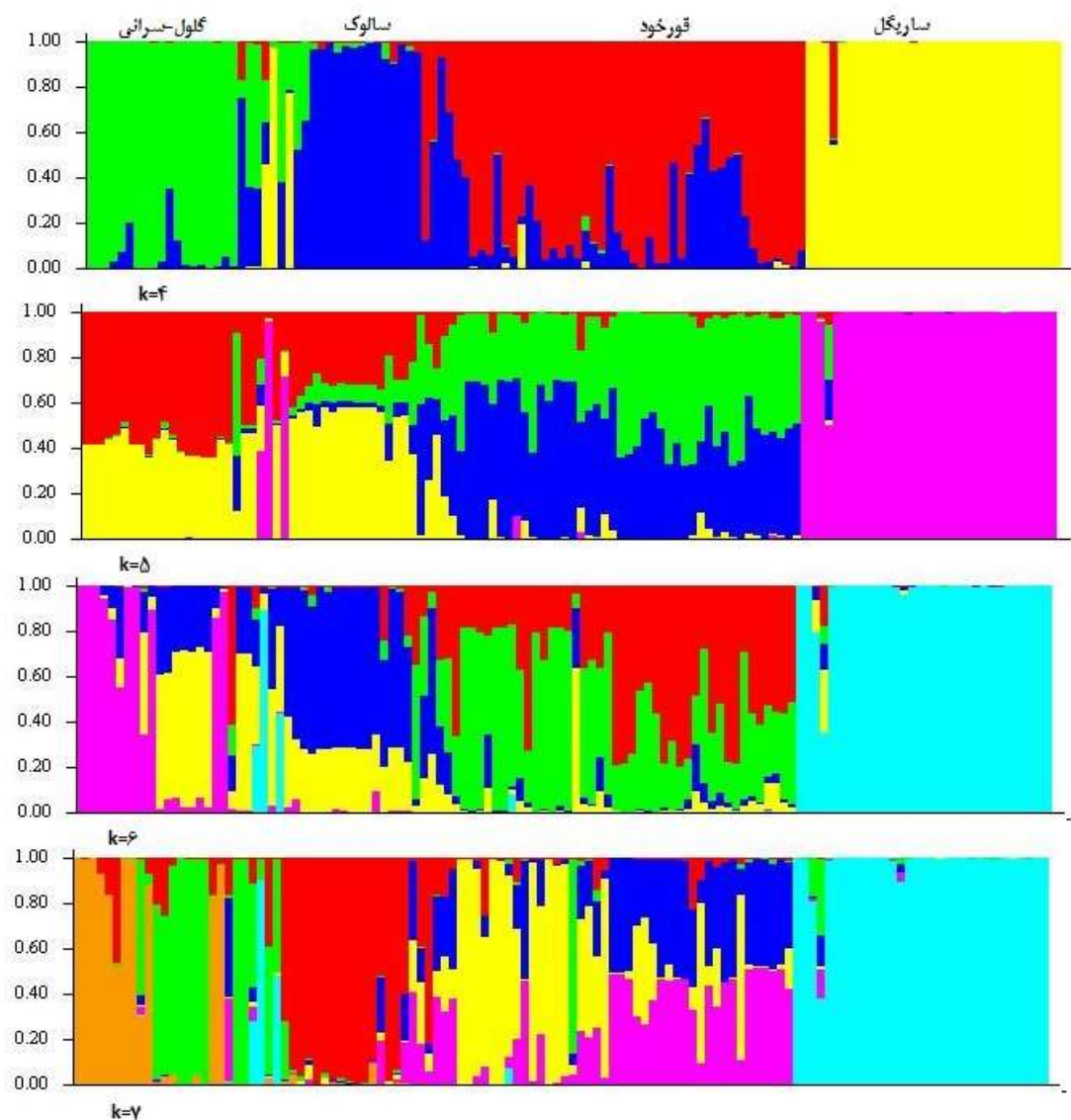


شکل ۲- نمودار حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) در نرم‌افزار GenAlex. Pop1: گلول-سرانی، Pop2: فورخود، Pop3: سالوک و Pop4: ساریگل

نتایج گروه‌بندی بر اساس الگوی پریچارد نشان دادند نمونه‌های جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر از نظر ساختار ژنتیکی تقریباً هفت گروه را تشکیل می‌دهند (جدول ۶ و شکل ۳).

جدول ۶- محاسبه میزان  $\ln P(D)$  با فرض تعلق تمام نمونه‌ها به یک جمعیت

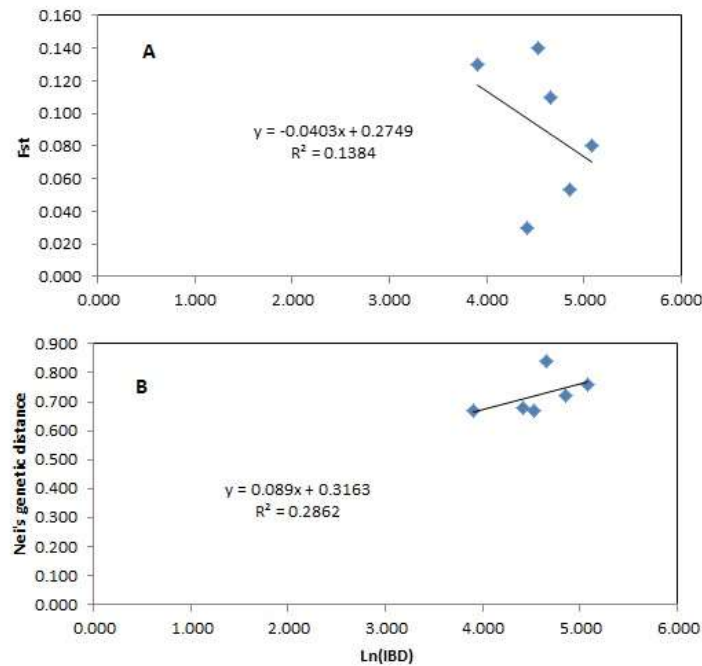
Ln probability of the data	تعداد جمعیت (K)
-۲۲۴۱/۰	۱
-۲۰۰۵/۳	۲
-۱۸۸۸/۴	۳
-۱۸۶۳/۳	۴
-۱۸۴۴/۲	۵
-۱۸۲۲/۳	۶
-۱۸۱۱/۴	۷
-۱۸۲۹/۷	۸
-۱۸۳۹/۲	۹
-۱۸۵۰/۲	۱۰



شکل ۳- گراف حاصل از نرم‌افزار STRUCTURE بر اساس  $k$  مساوی ۴ تا ۷. در این تصویر، هر فرد با میله‌ای عمودی نشان داده شده است.

همچنین بر اساس آزمون منتل (۱۰۰۰۰ تکرار)، این جدایی بین شاخص فاصله ژنتیکی نی مربوط به جمعیت‌های مختلف و فاصله جغرافیایی ( $p=۰/۱۲$ ) ( $r=۰/۵۳۵$ ) (شکل ۴B) مشاهده نشد.

نتایج وجود رابطه بین  $F_{st}$  و ماتریس فاصله اقلیدسی (IBD Matrix) بر اساس آزمون منتل نشان دادند جدایی بین جمعیت‌ها بر اثر فاصله جغرافیایی معنادار نیست (شکل ۴A) یا جدایی بر اثر فاصله رخ نداده است.



شکل ۴- نتایج آزمون متیل بین Fst و فاصله جغرافیایی (A) و فاصله ژنتیکی نی و فاصله جغرافیایی (B)

نتایج نشان دادند نسبت زیادی از افراد کل جمعیت‌ها (۹۰ درصد) به درستی به جمعیت اولیه متعلق بوده‌اند و فقط ۱۰ درصد افراد جمعیت‌ها از سایر جمعیت‌ها مهاجرت کرده‌اند. بیشترین عدم تطبیق در منطقه حفاظت‌شده قورخود و بیشترین مهاجرت افراد بین منطقه حفاظت‌شده قورخود و پارک ملی سالوک مشاهده شد (جدول ۷).

جدول ۷- نتایج آزمون تطبیقی بین جمعیت‌های مختلف و درصد درستی تطبیق در جمعیت‌ها

متعلق به خود جمعیت	متعلق به سایر جمعیت‌ها	گلول - سرانی	سالوک	قورخود	ساریگل
۲۵	۳	-	۱	-	۲
۲۷	۳	-	-	۳	-
۲۶	۶	-	۶	-	-
۳۲	-	-	-	-	-
۹۰	۱۰	-	-	-	-

### بحث و نتیجه‌گیری

وجود چنین انحراف‌هایی در برخی مناطق از نظر زیست‌شناختی توضیح‌پذیر و به نوع زندگی این جانور مربوط است. معمولاً پایکاها قدرت پراکندگی کمی دارند و پراکنش پیرامون محل زندگی، احتمال آمیزش با بستگان و آمیزش غیرتصادفی را زیاد می‌کند (Henry

نتایج تحلیل تعادل هاردی - واینبرگ در لوکوس‌ها نشان دادند تعداد لوکوس در منطقه گلول - سرانی از تعادل انحراف دارد و در پارک‌های ملی سالوک و ساریگل نیز یک لوکوس از این تعادل تبعیت نمی‌کند.

نرها تمایل دارند بیشتر از ماده‌ها پراکندگی داشته باشند و نوع سیستم جفت‌گیری به شکل هرج و مرج جنسی است (Zgurski and Hik, 2012). هرج و مرج جنسی یکی از عواملی است که مقدار درون‌آمیزی در جمعیت را کاهش می‌دهد (Vignieri, 2007). اگرچه سیستم جفت‌گیری پایکای افغانی کاملاً متغیر است و بسته به شرایط، یکی از سیستم‌های موجود را استفاده می‌کند (Macdonald, 2001)، استفاده از سیستم هرج و مرج جنسی در جفت‌گیری همانند بیشتر پایکاها، نقش زیادی در کاهش مقدار درون‌آمیزی آن خواهد داشت. بر اساس یافته‌ها، تنوع ژنتیکی به نسبت زیادی در محدوده مطالعه شده مشاهده می‌شود. تحلیل‌ها نشان دادند تمام لوکوس‌های استفاده شده چندریختی داشتند و ۶ تا ۸ آلل در کل جمعیت‌ها در هر لوکوس مشاهده شد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۶۴۸) مشابه سایر گونه‌های پایکا از جمله پایکای آمریکایی (بین ۰/۷۰۹ تا ۰/۷۳۶) بر اساس یافته‌های Peacock در سال ۱۹۹۷ و میانگین هتروزیگوسیتی (۰/۵۸۸) در پایکای آمریکایی بر اساس یافته‌های Merideth در سال ۲۰۰۵ است. این یافته‌ها نشان می‌دهند با وجود جدایی زیستگاهی، پایکاها تفاوت‌های ژنتیکی را در سطح بالایی حفظ می‌کنند (Merideth, 2005). Peacock (۱۹۹۷) نشان داد پایکاها تا دو کیلومتر بین لکه‌های زیستگاهی حرکت می‌کنند. اگر پایکاها به شکل منظم بین لکه‌های زیستگاهی مشخص حرکت کنند، نمونه‌های صیدشده جانوران یک منطقه و یا لکه زیستگاهی ممکن است منبع ژنی بزرگ‌تری مربوط به افراد همان لکه زیستگاهی و لکه‌های زیستگاهی مجاور نشان دهند؛ چنین ارتباطی ممکن است ویژگی ساختار ژنتیکی لکه‌ای باشد (Harrison, 1991). جریان ژنی

(et al., 2012) و درون‌آمیزی را افزایش می‌دهد که به انحراف از تعادل منجر می‌شود. نتایج محاسبه درون‌آمیزی در جمعیت‌های مطالعه شده نشان دادند مقدار درون‌آمیزی در تمام جمعیت‌ها همانند پایکای آمریکایی (در جنس نر به طور متوسط ۰/۴۴۸ و در جنس ماده ۰/۶۴۸ بر اساس پژوهش Robson در سال ۲۰۱۳) مثبت اما مقدار آن کم است. این مقدار بر اساس روش‌های وایر - کوکرهام و رابرتسون - هیل در مناطق حفاظت‌شده قورخود و گلول - سرانی بیشتر از دو منطقه دیگر برآورد شد و با وجود مثبت بودن مقدار آن در پارک‌های ملی سالوک و ساریگل، به جمعیت‌های دارای تولیدمثل تصادفی (نزدیک به صفر) بسیار نزدیک بود. در بیشتر گونه‌هایی که فاصله پراکندگی آنها کوتاه است، معمولاً افراد جمعیت با بستگانی زندگی می‌کنند که ممکن است جفت آنها نیز باشند (Zgurski and Hik, 2012). از سوی دیگر، ممکن است در جمعیت‌های پستانداران کوچکی که به وسیله فعالیت‌های انسانی به شدت تکه تکه شده‌اند، درون‌آمیزی به شدت مشاهده شود (Ricanova et al., 2011). سایر پژوهش‌ها در زمینه پایکاها (Henry et al., 2012) نشان دادند پایکاها (از جمله پایکای افغانی) معمولاً قدرت پراکندگی کمی دارند و با وجود این، مقدار شاخص درون‌آمیزی در جمعیت‌های مطالعه شده زیاد برآورد نشد (Henry et al., 2012). تحلیل‌های ساختار ژنتیکی سایر گونه‌ها از جمله موش جهنده (*Zapus trinotatus*) با میانگین پراکندگی کم، نشان دادند لزوماً قدرت پراکندگی محدود به درون‌آمیزی زیاد منتهی نمی‌شود (Vignieri, 2007). ویژگی‌های نامشخصی در پراکندگی موش جهنده دخیل هستند که احتمال درون‌آمیزی را کاهش می‌دهند. در این گونه،

تطبیقی، تمام افراد موجود در پارک ملی ساریگل به جمعیت اصلی خود تعلق داشتند. شهر اسفراین، این دو منطقه را از هم جدا کرده و جاده ارتباطی بین بجنورد و اسفراین با تردد زیاد، عاملی برای محدود کردن جریان ژن بین این دو منطقه است؛ بنابراین، جمعیت پارک ملی ساریگل نشان داد جدایی بین جمعیت‌ها ممکن است حتی در مقیاس محلی و فاصله‌های کوتاه اتفاق بیفتد. پژوهش‌های مربوط به پایکای آمریکایی (*Ochotona princeps*) نیز نشان دادند چنین جدایی در فاصله‌های کوتاه امکان‌پذیر است (Merideth, 2005). گروه‌بندی جمعیت‌ها بر اساس روش PCA و ترسیم درخت تبارشناختی مشخص کرد جمعیت‌های پارک ملی ساریگل و منطقه حفاظت‌شده گلول-سرانی ارتباط کمتری با سایر جمعیت‌ها دارند، ولی دو جمعیت سالوک و قورخود ارتباط ژنتیکی و جریان ژنی بسیاری با یکدیگر دارند. به نظر می‌رسد مسافت زیاد بین منطقه حفاظت‌شده گلول - سرانی و سه منطقه دیگر و قدرت پراکندگی کم پایکا، علت جریان ژنی کم بین آنها باشد، ولی ممکن است نبود چنین موانع انسان‌ساختی بین قورخود و سالوک که هر دو در سمت شرق قرار دارند، تبادل ژنی را افزایش داده باشد. نتایج آزمون تطبیقی نیز نتایج یادشده را تأیید می‌کنند. نتایج گروه‌بندی بر اساس نرم‌افزار STRUCTURE نشان دادند هفت زیرجمعیت مشخص در مناطق مطالعه‌شده پیش‌بینی می‌شوند؛ به عبارتی، چنانچه میزان K را ۴ در نظر بگیریم، جمعیت‌های مطالعه‌شده از نظر ساختار ژنتیکی به چهار گروه جداگانه تعلق دارند و هرچه میزان K به ۷ نزدیک‌تر شود، نمونه‌های حدواسط زیادی بین جمعیت‌ها مشاهده می‌شوند. نتایج گراف استخراجی از نرم‌افزار نشان دادند با هر میزان عددی K،

زیاد میان لکه‌های زیستگاهی بر مناطق دارای مقیاس محلی تأثیر می‌گذارد و افزایش تنوع ژنتیکی را باعث می‌شود. بر اساس یافته‌های He و همکاران (۲۰۰۶) و مطابق رابطه  $N_m \approx (1 / F_{ST} - 1) / 4$ ، وقتی مقدار  $N_m$  از ۰/۵ بیشتر و یا میزان  $F_{ST}$  از ۰/۳۳ کمتر باشد، جریان ژن رویکرد اصلی بین جمعیت‌ها در نظر گرفته می‌شود و برعکس، اگر میزان جریان ژن  $N_m$  از ۰/۵ کمتر و میزان تفاوت ژنتیکی  $F_{ST}$  از ۰/۳۳ بیشتر باشد، وجود ساختار ژنتیکی متفاوت مهم‌ترین عامل تفکیک جمعیت‌هاست (He et al., 2006). با توجه به کم‌تر بودن میزان تفاوت ژنتیکی کلی  $F_{ST}$  از ۰/۳۳ و بیشتر بودن مقدار جریان ژن  $N_m$  از ۰/۵ در مطالعه حاضر، تبادل ژنی بین زیستگاه‌ها زیاد و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها کم است. اگرچه مقادیر تفاوت ژنتیکی ( $F_{ST}$  و  $R_{ST}$ ) بین جمعیت‌ها کم است، تمام مقایسه‌های جفتی معنادار و نشانه‌ای از تفاوت ژنتیکی هرچند اندک بین جمعیت‌های مطالعه‌شده هستند. نتایج تحلیل AMOVA نشان دادند تفاوت معناداری بر اساس مقادیر  $F_{ST}$  و  $R_{ST}$  بین جمعیت‌ها وجود دارد. همچنین واریانس توجیهی (بر اساس  $F_{ST}$  برابر ۹۰/۵۱ درصد و  $R_{ST}$  برابر ۶۹/۳۶) به درون جمعیت‌ها تعلق دارد (جدول ۴) که تنوع ژنتیکی کم بین جمعیت‌ها را نشان می‌دهد و نتایج مقایسه‌های جفتی را تأیید می‌کند. تنوع ژنتیکی جمعیتی زیاد همراه با جریان ژن درخور توجه بین زیستگاه‌های لکه‌ای نشان می‌دهد پراکندگی (Dispersal) عامل اصلی و تأثیرگذار در پویایی جمعیت‌های مطالعه‌شده است (Merideth, 2005). مقادیر  $F_{ST}$  و  $R_{ST}$  بین پارک‌های ملی سالوک و ساریگل با وجود نزدیکی آنها به یکدیگر، بیش از حد انتظار بودند. آزمون تطبیقی نیز چنین جدایی آشکاری را تأیید کرد. بر اساس آزمون

به نظر می‌رسد کوچکی مقیاس مطالعه‌شده بر تأثیرگذاری فاصله در جریان ژن مؤثر بوده است. گروه‌بندی نمونه‌ها در STRUCTURE، وجود هفت زیرجمعیت را در چهار منطقه بررسی شده تأیید کرد. نتایج تحلیل‌های ریزماهواره نیز نشان دادند جمعیت‌های ساریگل و گلول - سرانی ارتباط کمتری با سایر مناطق دارند و جریان ژن بیشتری بین دو جمعیت سالوک و قورخود برقرار است. به نظر می‌رسد جریان ژنی کم بین منطقه حفاظت‌شده گلول - سرانی و سه منطقه دیگر به علت مسافت زیاد بین آنها و قدرت پراکندگی کم پایکا باشد. ممکن است موانع انسان‌ساخت از جمله شهر اسفراین بین این مناطق و جاده اصلی بجنورد - اسفراین علت نبود تبادل ژنتیکی زیاد بین دو منطقه نزدیک به هم سالوک و ساریگل باشد و شاید نبود چنین موانع انسان‌ساختی بین قورخود و سالوک که هر دو در سمت شرق قرار دارند، تبادل ژنی را افزایش داده باشد.

منطقه ساریگل تقریباً یک جمعیت را نشان می‌دهد و ارتباط کمتری با سایر جمعیت‌ها دارد. در مناطق قورخود، گلول - سرانی و سالوک گروه‌های حدواسط بیشتری مشاهده می‌شوند.

### جمع‌بندی نتایج ساختار ژنتیکی

نتایج تحلیل AMOVA، وجود ساختار ژنتیکی معناداری بین جمعیت‌های مختلف بررسی شده نشان می‌دهند. در همه ژن‌های مطالعه‌شده، بیشتر واریانس توجیهی به واریانس درون جمعیت‌ها مربوط است. به نظر می‌رسد ساختار ژنتیکی مختلف هرچند اندک بین جمعیت‌های مطالعه‌شده وجود دارد. بر اساس مطالعه‌های IBD، رابطه معناداری بین فاصله جغرافیایی و میزان جریان ژن (در این مطالعه از  $F_{ST}$  به این منظور استفاده شد) وجود ندارد که تأثیرنداشتن فاصله بین جمعیت‌ها بر میزان جریان ژن پایکای افغانی را نشان می‌دهد، هرچند

### منابع

- Aghamiri, S. H., Golestani, H., Bijhani, M. and Ahdokhshi, R. (2003) The Sarigol protected area and National park, DOE, Iran (in Persian).
- Khosravi sharaf abadi, R. (2011) Detecting hybridization between Iranian Wild Wolf (*Canis Lupus Pallipes*) and Free-Ranging Domestic Dog (*Canis Familiaris*) by Analysis of Microsatellite Markers in connection with recent wolf or dogs attacks on humans. MSc thesis, University of Tehran, Tehran, Iran (in persian).
- Bailie, J., Taylor, C. and Stuart, S. (2004) IUCN Red List of Threatened Species. IUCN Publication Services Unit, Cambridge, UK.
- Castillo, J. A., Epps, C. W., Davis, A. R. and Cushman S. A. (2014) Landscape effects on gene flow for a climate-sensitive montane species, the American Pika. *Molecular Ecology* 23: 843-856.
- Frankham, R. (2005) Genetics and Extinction. *Biological Conservation* 126: 131-140.
- Harrison, S. (1991) Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation. *Biological Journal of the Linnean Society* 42: 73-88.
- He, H., Yuan, X., Wei, C. and Yuan, F. (2006) Genetic variation of the mitochondrial ND4 region among geographical populations of *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) in China. *Journal of the Kansas Entomological Society* 79(3): 211-222.
- Hedrick, P. W. (2000) Genetics of populations. 2nd ed. Jones and Bartlett. Sudbury (MA).



- Henry, P., Sim, Z. J. and Russello, M. A. (2012) Genetic evidence for restricted dispersal along continuous altitudinal gradients in a climate change-sensitive mammal: the American Pika. *PLOS ONE* 7: e39077.
- Lanier, H. C. and Olson, L. E. (2012) Deep barriers, shallow divergences: reduced phylogeographical structure in the collared Pika (Mammalia: Lagomorpha: *Ochotona collaris*). *Journal of Biogeography* 40: 466-478.
- Lin, G., Ci, H., Thirgood, S. J., Zhang, T. and Su, J. (2010) Genetic variation and molecular evolution of endangered Kozlov's Pika (*Ochotona koslowi buchner*) based on mitochondrial cytochrome b gene. *Polish Journal of Ecology* 58: 563-568.
- Lissovsky, A. A. (2014) Taxonomic revision of Pikas *Ochotona* (Lagomorpha, Mammalia) at the species level. *Mammalia* 78(2): 199-216.
- Macdonald, D. (2001) *The new encyclopedia of Mammals*, Oxford University Press, England.
- Merideth, S. J. (2005) The impact of habitat spatial structure on Pika (*Ochotona princeps*) dispersal dynamics. MSc thesis, University of Nevada, Reno, USA.
- Peacock, M. M. (1997) Determining natal dispersal patterns in a population of North American pikas (*Ochotona princeps*) using direct mark-resight and indirect genetic methods. *Behavioral Ecology* 8: 340-350.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. (2012) GenAlex 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Randi, E., Davoli, F., Pierpaoli, M., Pertoldi, C., Madsen, A. B. and Loeschke, V. (2003) Genetic structure in otter (*Lutra lutra*) populations in Europe: implications for conservation. *Animal Conservation* 6: 93-100.
- Ricanova, S., Bryja, J., Cosson, J-F., Csongor, G., Choleva, L., Ambros, M., Sedlacek, F. (2011) Depleted genetic variation of the European ground squirrel in Central Europe in both microsatellites and the major histocompatibility complex gene: implications for conservation. *Conservation Genetics* 12: 1115-1129.
- Robson, K. M. (2013) American Pika population genetic structure, Demographic history and behavior in an atypical environment. MSc thesis, The University of British Columbia, Okanagan, Canada.
- Rousset, F. (2008) GENEPOP 4. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Segelbacher, G., Høglund, J. and Storch, I. (2003) From connectivity to isolation: genetic consequences of population fragmentation in capercaillie across Europe. *Molecular Ecology* 12: 1773-1780.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. and Shipley, P. (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Vignieri, S. N. (2007) Streams over mountains: influence of riparian connectivity on gene flow in the Pacific jumping mouse (*Zapus trinotatus*). *Molecular Ecology* 14: 1925-1937.
- Zgurski, J. M. and Hik, D. S. (2012) Polygynandry and even-sexed dispersal in a population of collared Pikas, *Ochotona collaris*. *Animal Behavior* 83: 1075-1082.
- Zgurski, J. M., Davis, C. S. and Hik, D. S. (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci for the collared pika (*Ochotona collaris*) and their cross amplification in five other *Ochotona* species. *Permanent Genetic Resource Note* 867-871.

