محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دورهٔ ۶۸، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۴
صفحات ۲۱-۱۵

تعیین جنسیت گونهٔ گرگ (*Canis lupus*) و سگ (*Canis lupus familiaris*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره کروموزوم Y

مرضیه اسدی آقبلاغی[۱]، محمد کابلی[۱*]، حمیدرضا رضایی[۲]، علی شعبانی[۳]
۱. گروه محیط زیست، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۲. گروه محیط زیست، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳. گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱/۲۳)

چکیده

گوشتخواران بزرگ‌جثه ازجمله گونه‌های جنس *Canis* از عناصر مهم و تکمیل‌کنندهٔ زنجیرهٔ غذایی اکوسیستم‌ها هستند. با توجه به کاهش شدید این گونه‌ها در بیشتر زیستگاه‌های طبیعی در سطح کشور، اجرای برنامه‌های حفاظتی در این راستا ضروری است. به‌دلیل جمعیت کم و مشکلات نمونه‌برداری مستقیم، به‌ویژه برای گونه‌های وحشی معمولاً نمونه‌ها به‌صورت غیرمستقیم به دست می‌آیند (از قبیل مدفوع یا مو) که در اغلب موارد جنسیت این نمونه‌ها نامشخص است. در این مطالعه با به‌کارگیری نشانگرهای ریزماهوارهٔ کروموزوم Y، تعیین جنسیت نمونه‌های گرگ و سگ انجام شد و از نشانگر ناحیهٔ (LOOP-D) ژنوم میتوکندری به‌منزلهٔ کنترل برای افزایش دقت آزمایش استفاده شد. براساس تشکیل شدن یا نشدن باند در دو جایگاه ریزماهواره ویژهٔ کروموزوم Y جنسیت افراد تعیین شد. تعیین جنسیت نمونه‌های گرگ به‌دست‌آمده یکی از عوامل اساسی در اجرای برنامه‌های حفاظتی محسوب می‌شود و به‌کارگیری کروموزوم‌های جنسی، ابزاری مفید برای تعیین جنسیت در مطالعات مربوط به مدیریت و حفاظت حیات وحش محسوب می‌شود.

کلیدواژگان: تعیین جنسیت، جنس *Canis*، کروموزومY، گرگ.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۶۳۲۲۳۰۴۴، فاکس: ۰۲۶۳۲۲۹۶۸۳
Email: mkaboli@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱. مقدمه

اگرچه گرگ‌ها (*Canis lupus*) توانایی زیستن در انواع زیستگاه‌ها را دارند در سال‌های اخیر در بیشتر مناطق کشور جمعیت آن‌ها به‌شدت کاهش یافته و در برخی مناطق به‌طور کامل نابود شده است. براساس طبقه‌بندی کنوانسیون تجارت بین‌المللی گونه‌های جانوری و گیاهان وحشی در معرض خطر انقراض CITES[1] در سال ۲۰۰۷ در طبقهٔ دو (در معرض خطر انقراض) قرار دارد (Ziaei, 2009). گرگ‌ها ازجمله طعمه‌خوارانی هستند که تأثیرات زیادی بر پویایی سیستم‌های اکولوژی طعمه- طعمه‌خوار و کنترل جمعیت‌های طعمه می‌گذارند. واحد اجتماعی گرگ‌ها به‌صورت دسته است، گرگ‌ها معمولاً مونوگام هستند و گرگ نر که گرگ آلفا نامیده می‌شود، هدایت گروه را به عهده دارد و در هر دسته تنها جفت های آلفا مجاز به جفت‌گیری‌اند (Mech & Boitani 2003). تعیین جنسیت یک عامل اساسی در برنامه‌های مدیریت حیات وحش و به‌ویژه در مطالعات رفتاری محسوب می‌شود و در گونه‌های مونوگام اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا نسبت‌های جنسی همواره بر عواملی مانند اندازهٔ جمعیت مؤثر، حداقل جمعیت زیستمند و نرخ رشد گونه‌ها مؤثر هستند و اغلب یک عامل کلیدی در حفاظت جمعیت‌ها محسوب می‌شوند، چنانچه در اجرای برنامه‌های معرفی مجدد و احیای گونه‌ها نسبت جنسی تعداد افراد مؤسس[2] و تعیین الگوی پراکندگی جنس‌های نر و ماده اهمیت زیادی دارد (Sundqvist *et al.*, 2001). در اغلب پستانداران تفاوت‌های جنسی (مانند تفاوت در اندازهٔ بدن، وجود شاخ و رنگ بدن) وجود دارد و تعیین جنسیت به‌صورت مستقیم انجام می‌شود ولی روش‌های مستقیم برای برخی گونه‌ها دشوار است، به‌ویژه برای گوشتخواران که اغلب نیاز به مشاهدهٔ جانور و یا شکار است (Christen *et al.*, 2004). در بسیاری موارد بین افراد نر و ماده تفاوت جنسی ظاهری وجود ندارد که در این صورت با استفاده از روش‌های مستقیم یا روش‌های ژنتیکی به‌صورت غیرمستقیم که اغلب زیست‌شناسان از نمونه‌های غیرتهاجمی (مانند مدفوع و مو) استفاده می‌کنند، تعیین جنسیت انجام می‌شود. در روش‌های ژنتیکی تعیین جنسیت با بررسی کروموزوم‌های جنسی و معمولاً با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[3] انجام می‌شود (Christen *et al.*, 2004). کروموزوم Y کوچک‌ترین کروموزوم در پستانداران است و اندازهٔ آن در سگ‌سانان ۲۷ میلیون جفت باز تخمین زده شده است. کروموزوم Y به نشانگر باارزشی در اکولوژی مولکولی و شناسایی افراد تبدیل شده است. در کل گونه‌های پستانداران ترکیب کروموزومی افراد نر به‌صورت XY و در افراد ماده به‌صورت XX است. این کروموزوم ژن‌های کمی دارد، همچنین تنوع نوکلئوتیدی کروموزوم‌های جنسی محدودتر از سایر نقاط ژنوم هسته است (Kariya *et al.*,2009). در این کروموزوم نوترکیبی صورت نمی‌گیرد و فقط در دو قطعهٔ کوچک (شبه‌اتوزومی) در هر دو انتهای این کروموزوم طی فرایند میوز با کروموزوم X نوترکیبی صورت می‌گیرد (Oliver *et al.*,1999; Olivier & Lust, 1998). دو جایگاه MS34A-MS34B در گونه‌های جنس *Canis* شناسایی شده‌اند. با توجه به اینکه جایگاه لوکوس‌های MS34B-MS34A در ناحیهٔ غیرترکیبی در کروموزوم Y قرار گرفته است (Sundqvist *et al.*, 2001) و لوکوس‌های مشابه آن‌ها در کروموزوم X وجود ندارد، کروموزوم Y شاخص مناسبی برای تعیین جنسیت در پستانداران است (Hellborg *et al*., 2004; Frankham, 2005; Godinho *et al*.2007.2011; Nishida *et al*.). به عنوان مثال تا کنون جایگاه‌های MS34B-MS34A ریزماهوارهٔ کروموزوم Y در مطالعات متعددی استفاده شده

1. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
2. Founder effect
3. Polymerase chain reaction

Archive of SID

www.SID.ir

است، با استفاده از این دو جایگاه ریزماهواره کروموزوم Y در اروپا تعیین جنسیت نمونه‌های بافت و نمونه‌های غیرتهاجمی جنس *Canis* صورت گرفت (Lacolina *et al.*, 2010; Sundqvist *et al.*, 2001). تعیین جنسیت و پلی‌مورفیسم گونه‌های نهنگ و شیر دریایی نیز با استفاده از نشانگرهای کروموزوم Y بررسی شد (Nishida *et al.*, 2009; Kariya *et al.*, 2007).

بنابراین، در این پژوهش سگ اهلی به منزلهٔ یکی از گونه‌های جنس *Canis* به‌دلیل سهولت دسترسی به نمونه‌ها نیز بررسی و تلاش شد که جنسیت نمونه‌های ژنتیکی دو گونهٔ گرگ و سگ با بررسی دو جایگاه MS34B-MS34A ریزماهواره کروموزوم Y تعیین شود.

۲. مواد و روش‌ها

طی این مطالعه دو لوکوس ریزماهواره ویژهٔ کروموزوم Y با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ۲۸ نمونه گرگ از استان‌های مختلف کشور و ۳۲ نمونه سگ بررسی شدند و برای یقین در تعیین جنسیت از نشانگر ناحیهٔ کنترل[1] ژنوم میتوکندری (d-loop)[2] به‌منزلهٔ کنترلی برای افزایش دقت آزمایش استفاده شد (در کل نمونه‌های بررسی‌شده تکثیر ناحیهٔ کنترل ژنوم میتوکندری برای تعیین کیفیت DNA استخراجی در نمونه‌ها به کار برده شد). شایان ذکر است که نمونه‌های سگ و بعضی نمونه‌های گرگ که به‌صورت مستقیم تهیه شدند، جنسیت آن‌ها هنگام نمونه‌برداری ثبت شد، ولی نمونه‌های گرگ متعلق به بانک ژن سازمان حفاظت محیط زیست جنسیت نامشخص داشتند. ابتدا نمونه‌های سگ که جنسیت مشخص داشتند آزمایش شدند و بعد از کسب اطمینان از صحت تعیین جنسیت، نمونه‌های گرگی که جنسیت آن‌ها هنگام نمونه‌برداری ثبت شده بود بررسی شدند و نتایج نشان داد که جنسیت نمونه‌ها با نتایج حاصل از این پژوهش همخوانی دارد. درنهایت نمونه‌های گرگی که جنسیت نامعلومی داشتند بررسی شدند.

۱.۲. نمونه‌برداری

با همکاری سازمان حفاظت محیط زیست از ۲۸ قلاده گرگ از نقاط مختلف کشور (همدان، زنجان، قزوین، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، سمنان، اصفهان، چهار محال و بختیاری، بجنورد، بوشهر، هرمزگان و خوزستان) و ۳۲ قلاده سگ از استان‌های همدان و زنجان نمونه بافت (ماهیچه) تهیه شد. نمونه‌ها ابتدا در الکل و سپس در سیلیکاژل قرار داده شدند و برای استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲.۲. آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های بافتی ابتدا در اتانول ۹۶درصد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت (AccuPrep) انجام شد. DNA استخراجی تا زمان PCR در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. کیفیت و کمّیت DNA استخراجی نیز با استفاده از ژل آگاروز یک‌درصد و دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین شد.

۳.۲. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الکتروفورز

به‌منظور تعیین جنسیت نمونه‌های گرگ و سگ از جایگاه‌های ژنی MS34A و MS34B استفاده شد. برای دو لوکوس A وB از دو آغازگر پیشرو و یک آغازگر پسرو استفاده شد و در واکنش PCR از چرخهٔ حرارتی پله‌ای رو به پایین[3] استفاده شد (جدول ۱) (Sundqvist et al., 2001).

تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل ۲۰ نانوگرم DNA یک واحد بین‌اللملی tap DNA پلی‌مراز، بافر PCR ۱x، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و آب‌مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر

1. Control region (d-loop)
2. Displacement loop
3. Touchdwon

Archive of SID

www.SID.ir

انجام گرفت. چرخهٔ دمایی برای تکثیر هر دو جایگاه با استفاده از برنامهٔ دمای پلهای رو به پایین انجام شد که عبارت بود از: ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجهٔ سانتیگراد و در ادامه ۴۸ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۲ درجهٔ سانتیگراد و ۴۵ ثانیه از ۵۹ـ ۶۹ درجه، یک دقیقه در ۷۲ درجه و بسط نهایی با ۷۲ درجه در ۱۰دقیقه. سپس محصول واکنش زنجیرهای پلیمراز به روی ژل آگاروز دودرصد و ژل اکریل آمید هشتدرصد جداسازی شدند. درنهایت تصاویر مربوط به ژلها با استفاده از دستگاه مستندساز ژل ثبت شد و باندهای تکثیرشده با استفاده از نرمافزار Gelpro Analyzer مشاهده شدند.

جدول۱. خصوصیات جایگاههای ژنی به کار برده‌شده در این مطالعه

جایگاه ژنی	وزن (جفت باز)	آغازگر	دمای اتصال
MS34A	۱۷۰-۱۸۲	F:AGCCATTCCTGGCCGAGTG R:GGTCCCCTTTTGCCATAGTGT	۵۹-۶۹
MS34B	۱۸۰-۱۹۲	F:AGCCATTCCTGGCCGAGTCC R:GGTCCCCTTTTGCCATAGTGT	۵۱-۵۸

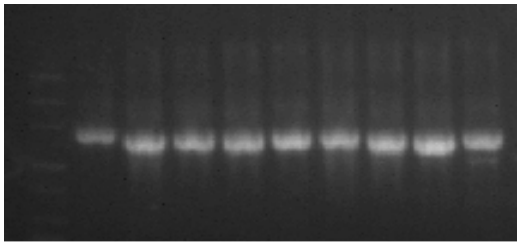
۳. نتایج

۱.۳. تکثیر ناحیهٔ کنترل ژنوم میتوکندری

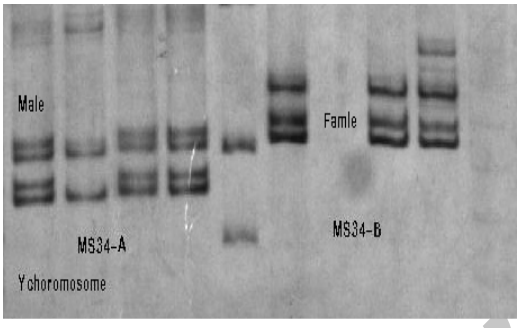
در تمامی نمونههای بررسیشده با استفاده از دو آغازگر پیشرو pro-L و پسرو phe-H ناحیهٔ کنترل ژنوم میتوکندری که (بهمنزلهٔ کنترلی برای تعیین جنسیت) تکثیر شد (شکل۱). اندازهٔ قطعهٔ تکثیرشده حدود ۱۴۰۰ـ ۱۵۰۰ جفت باز بود.

۲.۳. تکثیر دو جایگاه MS34B-MS34A ریزماهوارهٔ کروموزوم Y

این دو جایگاه در گرگها و سگهای ماده که جنسیت مشخصی داشتند تکثیر نشدند ولی در نمونههایی با جنسیت نر بهخوبی تکثیر شدند (شکل۲). همچنین این دو جایگاه در سه فرد از گرگها با جنسیت نامشخص تکثیر نشدند که این نمونهها بهمنزلهٔ نمونههای ماده شناسایی شدند (جدول۲).



شکل۱. تکثیر نشانگر ناحیهٔ کنترل ژنوم میتوکندری در نمونههای مطالعه‌شده (نمونههای نر و ماده)



شکل۲. تکثیر دو جایگاه (MS34B-MS34A) ریزماهوارهٔ کروموزومY نمونههای مطالعه‌شده

۴. بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه جایگاه لوکوسهای MS34A و MS34B روی بازوی کوچک (arm-p) بین سانترومر و ژن SRY، در ناحیهٔ غیر ترکیبی کروموزوم Y قرار دارند، این دو جایگاه فقط در نمونههای جنس نر تکثیر شدند. ولی ژنوم ناحیهٔ کنترل میتوکندری که در کل نمونهها بهمنزلهٔ کنترلی برای تعیین کیفیت DNA استخراجی در نمونهها به کار برده شد، در هر دو جنس نر و ماده تکثیر شد. با در نظر گرفتن اینکه این دو ریزماهواره نتایج یکسانی در تعیین جنسیت داشتند، میتوان نتیجه گرفت حتی با کاربرد یکی از این دو ریزماهواره براساس تشکیل شدن یا نشدن باند، میتوان جنسیت گونههای جنس *Canis* را بهخوبی تعیین کرد. کروموزوم Y پویایی زیادی دارد و به این دلیل بعضی ژنهای این کروموزوم را

Archive of SID

www.SID.ir

نمی‌توان در همهٔ گونه‌ها تکثیر کرد، بنابراین، در طراحی نشانگرها برای بخش‌های حفاظت شدهٔ این کروموزوم باید دقت صورت گیرد (Hellborg *et al.*, 2004). با توجه به اینکه جایگاه‌های ریزماهواره به کار گرفته‌شده در این مطالعه براساس گرگ‌های اروپا طراحی شده بودند ولی به‌خوبی در گرگ‌های ایران که از سطح تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به گرگ‌های اروپا برخوردارند، تکثیر شدند (Asadi, 2012). طی انجام این پژوهش در تکثیر شدن یا نشدن جایگاه‌های ریزماهواره کروموزوم Y بین دو گونهٔ گرگ و سگ تفاوتی مشاهده نشد. براساس نتایج Olivier در سال ۱۹۹۹ که این جایگاه‌ها را در گونه‌های مختلف بررسی کرد، نشان داد که این دو جایگاه در گونه‌های جنس *Canis* (گرگ، روباه، شغال، کایوت و دینگو) تکثیر می‌شوند، همچنین Rutledge و Koblmuller توانستند جنسیت گونه‌های کایوت، گرگ سرخ و گرگ خاکستری را در آمریکای شمالی با استفاده از بررسی جایگاه‌های ریزماهواره ویژهٔ کروموزوم Y در نمونه‌های بافتی و نمونه‌های غیرتهاجمی تعیین کنند (Olivier *et al.*,1999; Rutledge *et al.*, 2009, Koblmuller *et al.*, 2010). همچنین Sugimoto برای تعیین ساختار ژنتیکی دو گونهٔ در خطر انقراض ببر آمور و پلنگ با طراحی آغازگرهای ویژهٔ کروموزوم Y در گربه‌سانان توانستند جنسیت این دو گونه را براساس تشکیل شدن یا نشدن باند با استفاده از تکنیک RFLP در ۱۰۲ نمونهٔ سرگین و بافت تعیین کنند (Sugimoto *et al.*, 2006).

جدول۲. نتایج تعیین جنسیت نمونه‌های گرگ و سگ

تکثیر جایگاه MS34B	تکثیر جایگاه MS34A	تکثیر ناحیهٔ کنترل ژنوم میتوکندری	تعداد افراد		گونه	
–	–	✓	۴ نمونه ماده	۱۳	گرگ	نمونه‌هایی که جنسیت مشخص داشتند
✓	✓	✓	۹ نمونه نر			
–	–	✓	۱۵ نمونه ماده	۳۲	سگ	
✓	✓	✓	۱۷ نمونه نر			
–	–	✓	۳ نمونه ماده	۱۵	گرگ	نمونه‌هایی که جنسیت نامشخص داشتند
✓	✓	✓	۱۲ نمونه نر			

با توجه به تخریب شدید زیستگاه‌های طبیعی و کاهش جمعیت گونه‌های جنس *Canis* (ازجمله گونه‌های در معرض تهدیدی مانند شاه‌روباه و روباه ترکمنی) در بیشتر نقاط کشور و تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در برنامه‌های حفاظتی و مدیریت جمعیت‌ها تعیین جنسیت امری لازم به شمار می‌رود. معمولاً در اجرای برنامه‌های حفاظت حیات وحش به‌دلیل تراکم پایین گوشتخواران و ویژگی‌های خاص رفتاری آن‌ها مانند کمیاب‌بودن، فعالیت، داشتن خوی تهاجمی و نظایر آن، در بیشتر مواقع امکان نمونه‌برداری مستقیم و تعیین جنسیت به‌صورت مستقیم وجود ندارد، بنابراین سعی بر این است که از نمونه‌های غیرتهاجمی مانند مو و سرگین استفاده شود، که معمولاً جنسیت چنین نمونه‌هایی نامشخص است و با استفاده از نشانگرهای ویژهٔ کروموزوم‌های جنسی مانند کروموزوم Y می‌توان جنسیت نمونه‌ها را مشخص کرد (Frankham, 2005; Seddon *et al.*, 2005; Scandura, 2005; Scandura, 2004). امروزه استفاده از کروموزوم‌های جنسی به‌ویژه کروموزوم Y روش مناسبی برای تعیین جنسیت نمونه‌هایی که به دلایل متفاوتی مانند کشف نمونه از

Archive of SID

www.SID.ir

شکارچیان متخلف و اطلاعاتی در خصوص جنسیت آن‌ها در دسترس نیست، محسوب می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از همکاری کلیهٔ محیط‌بانان و کارشناسان محترم ادارهٔ کل حفاظت محیط زیست استان همدان که در مراحل نمونه‌برداری این پژوهش همکاری کردند، تقدیر و تشکر می‌شود. این پژوهش با حمایت مالی ادارهٔ کل حفاظت محیط زیست استان همدان در چارچوب طرح کاربردی آن ادارهٔ کل به انجام رسیده است.

REFERENCES

1. Asadi, A.M.2012 .Gene flow between wolf and dog using mitochondrial DNA (mtDNA) and Y chromosome microsatellite (SSRs) markers in Hamedan Province .Faculty Natural Resources .Thesis MSc.Tehran University .100 p (.in Persian).
2. Christen, L.W., Stewart, W.B., Bruce, W.B.Genetic methods improve accuracy of gender determination in beavers. Journal of Mammalogy .2004.85.6:1145–1148 .
3. Frankham R :Genetics and extinction . Biological Conservation .2005.126 .131–140.
4. Godinho, R,. Llaneza, L,. Blanco, J.C,. Lopes, S,. Álvares, F,. García, E.J., Palacios, V,. Cortes, Y,. Talegon, J., Ferrand, N . Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula .Molecular Ecology .2011 .20, 5154-5166.
5. Hellborg, L., Ellegren, H .Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes .Molecular Biology and Evolution. 2004: 2.11 .158–163.
6. Koblmuller, S., Nord, M., Wayne, R., Leonard, J .Origin and status of the Great Lakes wolf. Molecular Ecology .2009.18 . 2313–2326.
7. Kariya, T., Igarashi, M., Wada, K., Burkanov, V., Koyama, S., Hoshino, H., Oshida, T .Lack of sequence variation of Y chromosome-linked loci in Steller's sea lions) Eumetopias jubatus (from Iony Island and the Kuril Islands. Mammalogical Society of Japan .2009.34 :33–36 .
8. Lacolina, L., Scandura, M., Gazzola, A., Cappai, N., Claudia, C., Mattioli, L., Vercillo, F., Apollonio, M.Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves : Acontribution to the study of wolf-dog. Mammalian Biology .2010.75 .341–347.
9. Mech, L.D., Boitani, L .Wolf social ecology . In :wolves behavior, ecology and conservation .University of Chicago press, Chicago .Illinois .2003 .pp. 472.
10. Nishida, S., Goto, M.., Pastene, L., Kanda, N., Koike, H .Phylogenetic Relationships Among Cetaceans Revealed by Y-Chromosome Sequences .Zoological Science .2007 .24 .723–732.
11. Olivier, M.., Lust, G .Two DNA sequences specific for the canine Ychromosome. Animal Genetics .1998 .29 :146 -14.
12. Olivier, M., Breen, M.., Binns M., Lust, G . Localization and characterization of nucleotide sequences from the canine Y chromosome .Chromosome Research .1999 . 7 .223-233.
13. Rutledge, L., Garroway, C., Loveless, K., Patterson, B. Genetic differentiation of eastern wolves in Algonquin Park despite bridging gene flow between coyotes and grey wolves .Heredity .2010 .1-12.
14. Scandura**,** M .The use of microsatellites in the study of social structure in large mammals :Italian wolf and fallow deer as case studies .University of Bielefeld, Faculty of. 2004.pp:135.
15. Scandura, M .Individual sexing and genotyping from blood spots on the snow :A reliable source of DNA for non-invasive genetic surveys .Conservation Genetics . 2005 .6:871–874.
16. Seddon, J.M. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples .Conservation Genetics . 2005 .6 :147–149 .

Archive of SID

www.SID.ir

17. Sugimoto, T., Nagata, J., Aramilev, V., Belozor, A., Higashi1, S., McCullough, D. Species and sex identification from faecal samples of sympatric carnivores, Amur leopard and Siberian tiger, in the Russian Far East .2006 .7:799–802.

18. Sundqvist, A.K., Ellegren, H., Olivier, M., Vila, C .Y chromosome haplotyping in scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. Molecular Ecology. 2001 .10 .1959–1966.

19. Sundqvist, A.K., Bjomerfeldet, S., Leonard, J., Hailer, F., Hedhammar, A., Ellegre, H.,Vila, C .Unequal Contribution of Sexes in the Origin of Dog Breeds .Genetics .2006 . 172 .1121–1128.

20. Ziaei, H. A Field Guide to the Mammals of Iran .Tehran :Iran Wildlife Center.2009. 420 p .(in Persian).

Archive of SID

www.SID.ir