

جایگاه تبارشناختی و تنوع ژنتیکی خرس‌های قهوه‌ای ایران (*Ursus arctos*) براساس ناحیه کنترل میتوکندری

- **محمدرضا اشرف‌زاده:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، شهرکرد
 - **محمد کابلی*:** گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ۴۱۱۱
 - **محمدعلی ادیبی:** اداره کل حفاظت محیط زیست استان سمنان
 - **امید یوسفی:** اداره کل حفاظت محیط زیست استان آذربایجان غربی، ارومیه
 - **محسن امیری:** اداره کل حفاظت محیط زیست استان اردستان، خرم‌آباد
 - **محمدرضا مسعود:** اداره کل حفاظت محیط زیست استان آذربایجان شرقی، تبریز
- تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۵

چکیده

خرس‌های قهوه‌ای، برخلاف سایر گوشت‌خواران پرتحرک، ساختار ژنتیکی کاملاً مشخصی را در سطح جهان نشان می‌دهند که دربرگیرنده چندین کلاد میتوکندریایی است. علاوه بر این، جمعیت‌های خرس قهوه‌ای در خاورمیانه از جمله ایران در تهدید قرار دارند. با این وجود، هنوز جایگاه تبارشناختی و تنوع ژنتیکی این خرس‌ها در مقایسه با تبارهای جهانی خرس قهوه‌ای در ابهام قرار دارد. در پژوهش حاضر، ۵۰ نمونه (عضله، پوست و مو) متعلق به خرس قهوه‌ای از ایران گردآوری شد. تحلیل‌ها براساس یک قطعه ۶۱۴ جفت باز از ناحیه کنترل میتوکندری انجام شد. براساس یافته‌ها، خرس‌های ایران در مقایسه با خرس‌های قهوه‌ای مناطق دیگر جهان تنوع هاپلوتایپی به نسبت زیادی (۵۰ فرد، ۲۲ هاپلوتایپ) را نشان دادند. تحلیل‌های این ناحیه میتوکندریایی، خرس‌های ایران را در یک کلاد مادری کاملاً مجزا از دیگر کلادهای جهانی قرار داد، که دربرگیرنده دو-سه زیرکلاد گیتاشناختی شامل (۱) زیرکلاد البرز: خرس‌های ساکن کوه‌های البرز تا ارسباران، (۲) زیرکلاد زاگرس: خرس‌های غرب کشور از کوه‌های سه‌سند (آذربایجان شرقی) تا زاگرس جنوبی (کازرون) و (۳) زیرکلاد فارس: خرس‌های ساکن جنوب شرقی زاگرس (مرودشت تا اقلید، استان فارس) است. یافته‌های FST و AMOVA، وجود ساختار ژنتیکی معنی‌داری را بین زیرکلادهای خرس قهوه‌ای در ایران تأیید می‌نماید. بنابراین، جمعیت‌های امروزی خرس قهوه‌ای در ایران، علاوه بر تنوع هاپلوتایپی به نسبت زیاد، ساختارهای گیتاشناختی مشخصی را نمایش می‌دهند.

کلمات کلیدی: خرس قهوه‌ای، تنوع هاپلوتایپی، زیرکلاد، البرز، زاگرس



مقدمه

ساختار تبارگیتاشناختی گسترده‌ای (براساس ژنوم میتوکندری) را در سطح جهان نشان می‌دهند (Davison و همکاران، ۲۰۱۱؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۸). در این میان، خرس‌های قهوه‌ای در خاورمیانه از جمله ایران بخش عمده‌ای از گستره تاریخی خود را از دست داده و در خطر انقراض هستند (Boitani و همکاران، ۲۰۰۸؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹). از سوی دیگر، توسعه و گستردگی فعالیت‌های انسانی در ایران (به‌عنوان کشوری در حال توسعه) می‌تواند پیامدهای جبران‌ناپذیری بر جمعیت‌های گوشت‌خواران بزرگ جنه (مانند خرس قهوه‌ای) داشته باشد. بنابراین دست‌یابی به دانش قابل اطمینان در زمینه تنوع و وضعیت ژنتیکی جمعیت‌های خرس قهوه‌ای در مناطق مختلف کشور از اهمیت بالایی برخوردار است. در این پژوهش، تلاش بر این است که با استفاده از ناحیه کنترل (Control region) میتوکندریایی جایگاه تبارشناختی و تنوع ژنتیکی خرس‌های قهوه‌ای ایران در مقایسه با سایر خرس‌های قهوه‌ای جهان مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

محدوده مورد مطالعه، در برگرفته گستره زیستگاه‌های خرس قهوه‌ای در کوه‌های البرز، زاگرس و آذربایجان است. تعداد ۵۰ نمونه (عضله، پوست و مو) از سال ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۴ گردآوری شد. شکل (۱) موقعیت گیتاشناختی نمونه‌های استفاده شده در تحلیل‌های ژنتیکی را نشان می‌دهد. برای استخراج دی‌ان‌ای از کیت مخصوص استخراج دی‌ان‌ای از بافت ساخت شرکت‌های کیزن و بیونیر و با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای تکثیر توالی‌های مورد نظر از دی‌ان‌ای با غلظت ۲۰ تا ۸۰ نانوگرم استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از مسترمیکس‌های با غلظت ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ساخت شرکت امپلیکن دانمارک انجام شد. ترکیب مسترمیکس شرکت امپلیکن به شرح زیر است: Tris-HCl با pH ۸/۵، $(NH_4)_2SO_4$ ، ۳ میلی مولار از $MgCl_2$ ، ۰/۲٪ از Tween@20، ۴ میلی مولار از هر dNTP، ۲/۲ واحد میکرولیتر امپلیکن Taq دی‌ان‌ای پلی‌مرز. ترکیب ماده به کار رفته در واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس، میکرولیتر ۲۵/۱ از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱ میکرولیتر دی‌ان‌ای و ۹ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استفاده شد. در هنگام آماده‌سازی نمونه‌ها برای واکنش PCR، یک میکروتیوب به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. یک قطعه ۶۱۴ جفت باز مربوط به بخشی از ناحیه کنترل میتوکندری و بخش انتهایی ۵' در ژن tRNA-Pro با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی (Hailer و همکاران، ۲۰۱۲) تکثیر شد: UCRS1F (3'-ACAGCTCCACTACCAGCACCC-5')

در طول قرن‌های اخیر جمعیت‌های خرس قهوه‌ای، به‌ویژه در اروپای غربی، بخش‌های جنوبی آمریکای شمالی، جنوب آسیا و آفریقای شمالی آسیب‌های زیادی را از دست‌اندازی‌های مستقیم انسان و تغییر زیستگاه‌ها متحمل شدند. خرس‌ها در برخی از این مناطق به‌طور کامل نابود شدند و یا کاهش قابل توجهی را تجربه کرده و به جمعیت‌های کوچک و مجزا محدود شدند (Swenson و همکاران، ۲۰۱۱؛ Zedrosser و همکاران، ۲۰۰۱؛ Servheen و همکاران، ۱۹۹۹). در سطح جهانی، تعداد و گستره توزیع خرس قهوه‌ای در طول ۱۰۰ سال گذشته در حدود ۵۰ درصد کاهش داشته است (Servheen، ۱۹۹۰). از نظر تاریخی، خرس‌های قهوه‌ای بخش گسترده‌ای از خاورمیانه- از صحرای سینا تا نواحی کوهستانی ایران- را اشغال می‌کردند (Boitani و همکاران، ۲۰۰۸)، در حالی که امروزه فقط به صورت جمعیت‌های کوچک و مجزا در ایران، عراق و ترکیه حضور دارند (Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Boitani و همکاران، ۲۰۰۸؛ Ridings، ۲۰۰۶). خرس‌های قهوه‌ای خاورمیانه که از آن‌ها به‌عنوان جمعیت‌های غفلت شده یاد می‌شود، جزو جمعیت‌های در خطر انقراض هستند (Davison و همکاران، ۲۰۱۱؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Boitani و همکاران، ۲۰۰۸؛ Ridings، ۲۰۰۶؛ Togan و Can، ۲۰۰۴). از سوی دیگر، تمایزهای ریخت‌شناختی اساسی بین خرس‌های قهوه‌ای در مناطق مختلف، توصیف شمار زیادی از زیرگونه‌ها را در اوراسیا در پی داشته است. در طبقه‌بندی‌های اولیه بیش از ۲۰۰ زیرگونه و در جدیدترین بازنگری‌ها تعداد هشت زیرگونه معرفی شده است (Korsten و همکاران، ۲۰۰۹). به‌ر حال، تحلیل‌های ژنتیکی توافق‌چندانی با این فهرست‌ها نشان نمی‌دهند. برای نمونه، تحلیل توالی‌های سیتوکروم b و ناحیه کنترل میتوکندری، فقط یک هاپلوگروپ را در تمام جمعیت‌های خرس قهوه‌ای ساکن در شمال اوراسیا شناسایی نموده است (ناحیه‌ای به اندازه ۱۲۰۰۰ کیلومتر از شرق تا غرب) (Korsten و همکاران، ۲۰۰۹). با این وجود، ممکن است عوامل بوم‌شناختی در مقایسه با عوامل ژنتیکی توضیح بهتری را برای وجود اختلاف‌های ریخت‌شناختی بین زیرگونه‌های شناسایی شده-زیرگونه‌هایی که بر اساس تمایزهای ریخت‌شناختی توصیف شده‌اند و تحلیل‌های ژنتیکی توافقی با آن‌ها ندارند- ارایه دهند (Paetkau و همکاران، ۱۹۹۸). در مجموع هنوز توافق همگانی در زمینه آرایه‌شناسی خرس‌های قهوه‌ای وجود ندارد (Keis، ۲۰۱۳).

مدیریت و حفاظت از حیات وحش نیازمند داشتن تصویری جامع از تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی در ساختارهای گیتاشناختی است. جمعیت‌های خرس قهوه‌ای بر خلاف سایر گوشت‌خواران پرتحرک،

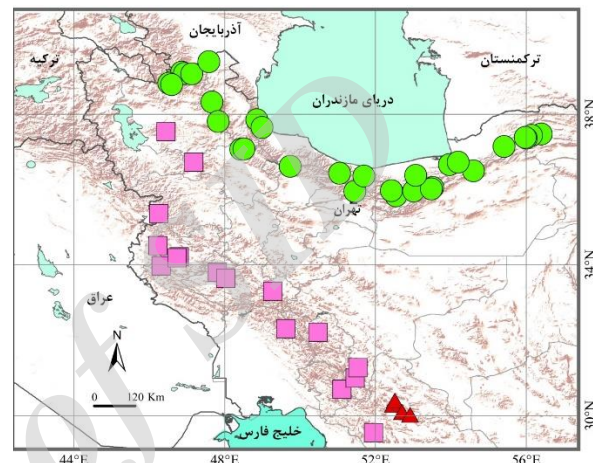
انجام شد. به منظور اجتناب از بهینه‌سازی محلی در استنتاج درخت به دست آمده، جستجوهای احتمال بیشینه با ۲۰۰ تکرار اجرا شد. تعداد ۱۰۰۰ تکرار برای دست‌یابی به درخت بوت‌استرپ و ۱۰۰۰ تکرار برای دست‌یابی به درخت بوت‌استرپ سریع در نظر گرفته شد. علاوه بر این، روابط تبارشناختی بین هاپلو تایپ‌ها، براساس تحلیل اتصال میانه (Bandelt و همکاران، ۱۹۹۹) برآورد شد. به این منظور، از نرم‌افزار ۴,۶,۱,۳ Network برای استنتاج روابط تبارشناختی بین هاپلو تایپ‌ها در توالی‌های ناحیه کنترل استفاده شد. تعداد هاپلو تایپ‌ها، جایگاه‌های چندریختی، تنوع هاپلو تایپی و تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از ۵,۱۰ DnaSP (Rozas و Librado, ۲۰۰۹) محاسبه شد.

برای تعیین سطوح ساختار جمعیتی از تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) و نمایه F_{ST} (Cockerham و Weir, ۱۹۸۴) در نرم‌افزار ۳,۵ Arlequin (Lischer و Excoffier, ۲۰۱۰) استفاده شد. تحلیل‌ها با ۱۰۰۰۰ تکرار و در دو سطح سلسله مراتبی انجام شد. در اولین سطح تنها خرس‌های قهوه‌ای ایران در تحلیل استفاده شدند، در حالی که در دومین سطح تمامی کلادهای خرس قهوه‌ای و خرس قطبی تحلیل شدند.

نتیجه

تحلیل تبارشناختی قطعه ۶۱۴ جفت باز از ناحیه کنترل براساس دو شیوه استنتاج بی‌زین و احتمال بیشینه، نتایج مشابهی را به دست داد (شکل ۲). بر این اساس، خرس‌های قهوه‌ای ایران در تباری مجزا از دیگر خرس‌های قهوه‌ای جهان و در سه زیرکلادهای مجزای گیتاشناختی دربرگیرنده البرز (شمال ایران)، زاگرس (غرب ایران) و زاگرس جنوب شرقی (فارس) تقسیم شدند. زیرکلادهای البرز (نمونه تمامی خرس‌های قهوه‌ای ساکن در شمال ایران از شرق البرز (خراسان شمالی) تا کوه‌های ارسباران (آذربایجان شرقی) را در بر می‌گیرد. این جمعیت دربرگیرنده موقعیت‌های نمونه‌برداری پیوسته از منطقه حفاظت شده قرخود تا پارک ملی گلستان، دامغان، مینودشت، کردکوی، بندر گز، ساری، آمل، منطقه حفاظت شده پرور، منطقه حفاظت شده البرز مرکزی، فیروزکوه، شمیرانات، کلاردشت، رودبار، منطقه حفاظت شده سرخ آباد، تالش، کوه‌های بزغوش، مشکین شهر، منطقه حفاظت شده مغان، کلیبر، منطقه حفاظت شده ارسباران و منطقه حفاظت شده دیزمار است. خرس‌های قهوه‌ای غرب کشور (۱۶ نمونه) از زاگرس جنوبی در محدوده کازرون (استان فارس) تا کهگیلویه و بویراحمد، اصفهان (سمیرم)، چهارمحال و بختیاری، لرستان، خوزستان، ایلام، کرمانشاه، کردستان، تکاب (آذربایجان غربی) و بخش جنوبی کوه‌های سه‌سهند (آذربایجان شرقی) زیرکلادهای زاگرس را تشکیل دادند. نکته قابل توجه

و UCRS1R (۵'GTACACGTGCGTTCGTTTC-3') واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ۳۵ چرخه با واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد در پنج دقیقه، واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت پنج دقیقه اجرا شد.



شکل ۱: موقعیت گیتاشناختی نمونه‌های خرس قهوه‌ای استفاده

شده در تحلیل‌ها

شکل‌های هندسی، زیرکلادهای شناسایی شده را نشان می‌دهند: دایره: زیرکلادهای البرز، مربع: زیرکلادهای زاگرس، مثلث: زیرکلادهای فارس

از نرم‌افزار ۳/۰ Seqscape برای ویرایش نوکلئوتیدی توالی‌ها استفاده شد. ردیف‌یابی توالی‌ها با استفاده از (Thompson) ClustalW و همکاران، ۱۹۹۴) در نرم‌افزار ۶ Mega (Tamura و همکاران، ۲۰۱۳) انجام شد. توالی‌های متعلق به خرس سیاه آسیایی (*U. tibetanus*)، خرس سیاه آمریکایی (*U. americanus*) و خرس غار (*U. spelaeus*) به‌عنوان برون‌گروه استفاده شدند.

بهترین مدل‌های جایگزینی نوکلئوتیدی با استفاده از ۱,۱,۱ PartitionFinder (Lanfear و همکاران، ۲۰۱۴ و ۲۰۱۲) با معیار اطلاعاتی بی‌زین تعیین شد. درخت‌های تبارشناختی با استفاده از شیوه‌های احتمال بیشینه و استنتاج بی‌زین رسم شدند. تحلیل‌های بی‌زین با استفاده از نرم‌افزار ۳,۲,۲ MrBayes (Huelsenbeck و Ronquist, ۲۰۰۳)، بر اساس چرخه زنجیره مارکوف (MCMC) با چهار اجرای هم‌زمان و تعداد ۵۰ میلیون تکرار اجرا شد. نمونه‌برداری‌ها در هر ۱۰۰۰ تکرار انجام شد و ۱۰ درصد درخت‌های حاصل شده از تحلیل کنار گذاشته شدند و برای دست‌یابی به بهترین درخت از قانون اکثریت استفاده شد. تحلیل‌های احتمال بیشینه با استفاده از ۲,۲ RAXML (Stamatakis, ۲۰۱۴)، با مدل GTRGAMMA



در سطح جهانی، عمومی‌ترین هاپلوتایپ به کلاد 3a اختصاص دارد که در بین ۹۳ فرد متعلق به آلاسکا، شرق دور روسیه تا روسیه مرکزی، روسیه غربی، استونی، فنلاند، رومانی و بلغارستان مشاهده شده است. سایر کلادها در مقایسه با کلاد 3a پراکنش به نسبت محدودتری دارند. کلاد 3b در شرق هوکایدو (ژاپن)، شرق دور روسیه و آلاسکا حضور دارد. کلاد 4 در آمریکای شمالی و کلاد 1 در اروپای غربی مشاهده می‌شود. هاپلوتایپ‌های متعلق به کلاد 3d فقط در جنوب هوکایدو مشاهده می‌شوند. کلاد 2a فقط در جزایر ABC در آلاسکا مشاهده شده است.

تحلیل AMOVA نشان داد که اختلاف ژنتیکی در بین زیرکلادهای جهانی (۸۸/۸۱ درصد) بیش از اختلاف ژنتیکی در داخل (۱۱/۱۹ درصد) این گروه‌ها است (جدول ۱). هم‌چنین، تحلیل AMOVA نشان داد که اختلاف ژنتیکی بسیار زیاد و معنی‌داری در بین زیرکلادهای ایران (۷۸/۳۲ درصد) وجود دارد. علاوه بر این، نمایه FST نیز وجود یک ساختار ژنتیکی معنی‌دار را در بین زیرکلادهای شناسایی شده خرس قهوه‌ای در ایران مورد تأیید قرار می‌دهد (جدول ۱).

جدول ۲ برخی آماره‌های ژنتیکی مربوط به قطعه ۶۱۴ جفت باز از ناحیه کنترل را بر اساس یک دسته داده شامل ۵۰ توالی از ایران و ۳۲۱ توالی استخراج شده از بانک ژن نشان می‌دهد. در مجموع، ۸۴ جایگاه متغیر (۷۴ جایگاه پارسیمونی و ۱۰ جایگاه تک نوکلئوتیدی) و ۱۱۱ هاپلوتایپ شناسایی شد. در بین توالی‌های ایران، ۲۲ هاپلوتایپ جدید شناسایی شد. زیاده‌ترین و کم‌ترین تنوع هاپلوتایپی در میان تمامی جمعیت‌های خرس قهوه‌ای، به ترتیب در بین خرس‌های البرز (۰/۹۲۶، انحراف معیار = ۰/۲۴۱) و خرس‌های فارس (۰/۰۰۰) مشاهده شد. تنوع نوکلئوتیدی در بین خرس‌های البرز و زاگرس به ترتیب در حدود ۰/۰۴۷۸ (انحراف معیار = ۰/۰۰۰۳۵) و ۰/۰۰۴۱ (انحراف معیار = ۰/۰۰۰۸۳) برآورد شد. قابل ذکر است که اغلب کلادهای جهانی همانند خرس‌های ایران از تنوع نوکلئوتیدی به نسبت کم برخوردار بوده‌اند.

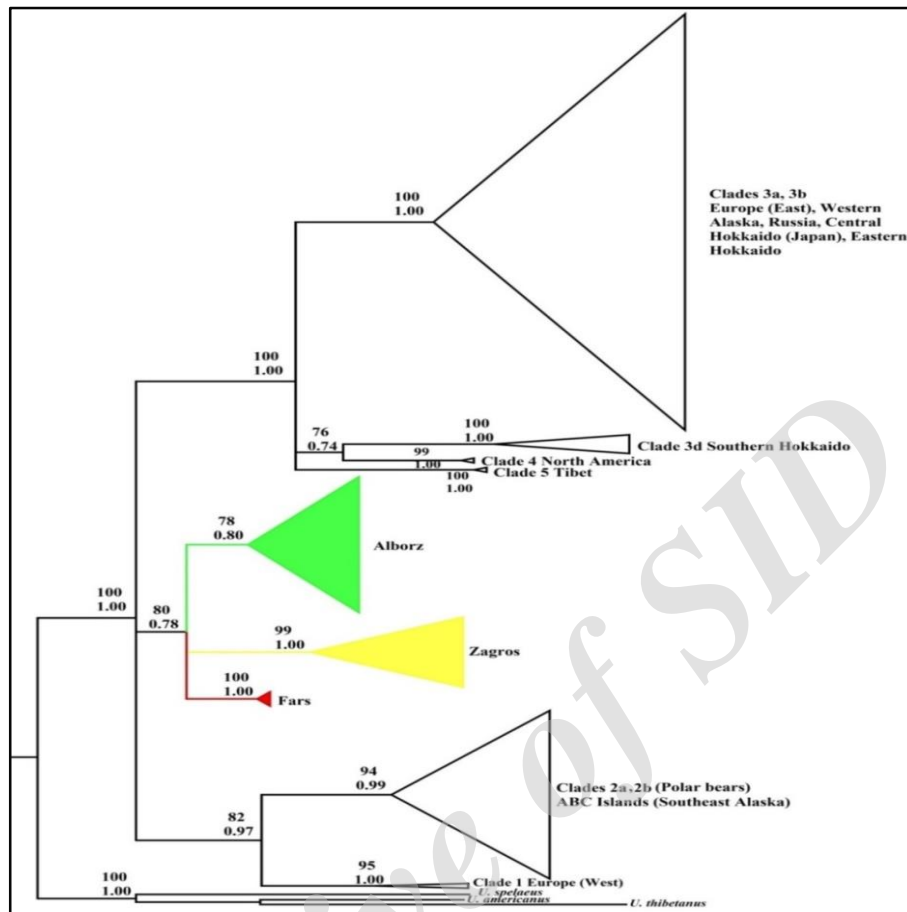
این‌که خرس‌های قهوه‌ای زاگرس جنوب‌شرقی، که به‌نظر می‌رسد از نظر گیتاشناختی در یک محدوده مجزای به نسبت کوچک در شهرستان‌های مرودشت و امامزاده اسماعیل و اقلید ساکن هستند، یک زیرکلاد مجزای دیگری را نسبت به سایر خرس‌های زاگرس به خود اختصاص می‌دهند.

تحلیل شبکه هاپلوتایپی خرس‌های ایران را در سه زیرکلاد مجزا قرار می‌دهد (شکل ۳). بر این اساس، خرس‌های نوار شمالی ایران (۳۰ نمونه) از منطقه حفاظت شده قرخود (خراسان شمالی) در شرق البرز و در امتداد رشته کوه‌های البرز تا غرب البرز و از آن‌جا تا مناطق حفاظت شده ارسباران و دیزمار (آذربایجان شرقی)، با ۱۴ هاپلوتایپ، در زیرکلاد البرز قرار گرفتند. در این تحلیل، پنج نمونه از تهران (ارجمند)، مازندران (سوادکوه)، سمنان (منطقه حفاظت شده پرور)، گلستان (کردکوی و مینودشت) در یک هاپلوتایپ مشترک قرار می‌گیرند. هاپلوتایپ مشترک دیگر بین پنج نمونه از آذربایجان شرقی (منطقه حفاظت شده ارسباران، شمال کلیبر، بزغوش)، زنجان (منطقه حفاظت شده سرخ‌آباد) و مازندران (لاریجان) شکل می‌گیرد. هم‌چنین، چهار نمونه از آذربایجان شرقی (شمال ارسباران)، اردبیل (منطقه حفاظت شده مغان، گیلان (تالش) و سمنان (منطقه حفاظت شده پرور) هاپلوتایپ مشترک دیگری را تشکیل می‌دهند. خرس‌های غرب کشور (۱۶ نمونه)، همانند درخت تبارشناسی، از کازرون (فارس) در جنوب زاگرس و در امتداد رشته کوه‌های زاگرس تا زاگرس شمالی و جنوب کوه‌های آذربایجان (سهند) به زیرکلاد زاگرس تعلق دارند. عمومی‌ترین هاپلوتایپ در این منطقه با در بر گرفتن هشت نمونه در گستره‌ای از استان‌های فارس (کازرون)، کهگیلویه و بویراحمد (کوه‌های ساورز)، اصفهان (منطقه حفاظت شده دنا و سمیرم)، لرستان (منطقه حفاظت شده سفیدکوه، منطقه حفاظت شده اشتران‌کوه)، خوزستان (منطقه حفاظت شده شیمبار) و کرمانشاه (منطقه حفاظت شده قلاج) شکل می‌گیرد. خرس‌های ساکن جنوب شرق زاگرس (چهار نمونه) در محدوده مرودشت و امامزاده اسماعیل، به یک هاپلوتایپ تعلق داشته و در زیرکلاد فارس قرار می‌گیرند.

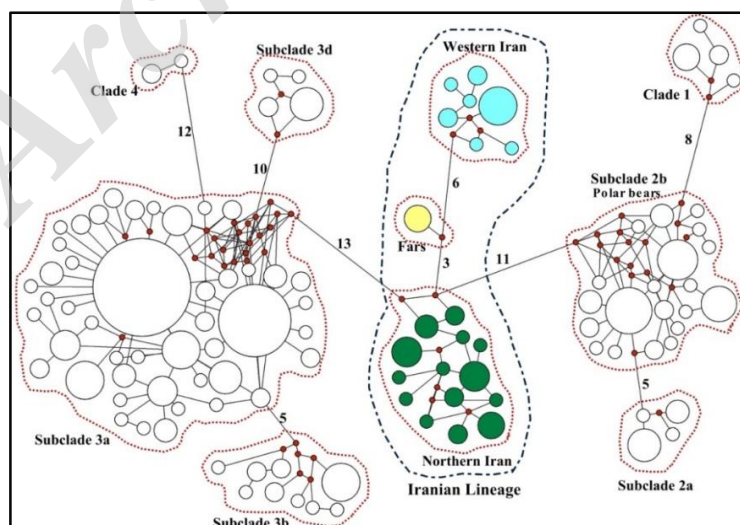
جدول ۱: تحلیل واریانس مولکولی. تحلیل اول: در بین سه زیرکلاد ایران، تحلیل دوم: در بین تمامی زیرکلادها و کلادهای خرس قهوه‌ای و خرس قطبی

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد تغییرات	F_{ST}	p -value
تحلیل اول				
بین زیرکلادها	۲	۷۸/۳۲	۰/۷۸۳	۰/۰۰۰
درون زیرکلادها	۴۷	۲۱/۶۸		
تحلیل دوم				
بین زیرکلادها	۹	۸۸/۸۱	۰/۸۸۸	۰/۰۰۰
درون زیرکلادها	۱۷۸	۱۱/۱۹		





شکل ۲: روابط تبارشناختی بین خرس‌های قهوه‌ای ایران و سایر خرس‌های قهوه‌ای و قطبی براساس ۶۱۴ جفت باز از ناحیه کنترل میتوکندری خرس سیاه آسیایی (*U. thibetanus*)، خرس سیاه آمریکایی (*U. americanus*) و خرس غار (*U. spelaeus*) به‌عنوان برون‌گروه استفاده شدند. اعداد روی شاخه‌ها مقدار بوت استرپ (بالا) و احتمال پسین (زیر) را به ترتیب براساس احتمال بیشینه و استنتاج بی‌زین نشان می‌دهند.



شکل ۳: روابط تبارشناختی بین خرس‌های قهوه‌ای ایران و سایر خرس‌های قهوه‌ای و قطبی با استفاده از روش اتصال میانه، بر اساس توالی‌های ۶۱۴ جفت باز از ناحیه کنترل میتوکندری

جدول ۲: برخی آماره‌های ژنتیکی برای خرس‌های ایران در مقایسه با سایر کلادهای خرس‌های قهوه‌ای و قطبی براساس توالی ۶۱۴ جفت باز از ناحیه کنترل

گروه	<i>n</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i> (SD)	<i>Pi</i> (SD)	<i>K</i>	<i>P</i>
کلاد ۱	۸	۴	۰/۷۵۰(۰/۱۳۹)	۰/۰۰۴۶۵(۰/۰۰۱۷۵)	۲/۸۵۷	۹
کلاد ۲a	۱۱	۴	۰/۶۷۳(۰/۱۲۳)	۰/۰۰۳۴۴(۰/۰۰۰۶۷)	۲/۱۰۹	۵
کلاد ۲b	۵۲	۲۰	۰/۹۰۰(۰/۰۲۴)	۰/۰۰۴۹۸(۰/۰۰۰۴۷)	۳/۰۵۹	۱۸
کلاد ۳a	۲۱۸	۴۶	۰/۷۹۷(۰/۰۲۶)	۰/۰۰۲۷۵(۰/۰۰۰۱۸)	۱/۶۹	۳۰
کلاد ۳b	۱۹	۹	۰/۸۱۹(۰/۰۸۲)	۰/۰۰۹۳۷(۰/۰۰۱۳)	۵/۷۵۴	۱۹
کلاد ۳c	۱۰	۴	۰/۶۴۴(۰/۱۵۲)	۰/۰۰۳۵۸(۰/۰۰۱۲۲)	۲/۲	۷
کلاد ۴	۳	۲	۰/۶۶۷(۰/۳۱۴)	۰/۰۰۲۱۷(۰/۰۰۱۰)	۱/۳۳۳	۲
زیرکلاد البرز	۳۰	۱۴	۰/۹۲۶(۰/۰۲۴)	۰/۰۰۴۷۸(۰/۰۰۰۳۵)	۲/۹۳۳	۱۰
زیرکلاد زاگرس	۱۶	۷	۰/۷۵۲(۰/۱۰۷)	۰/۰۰۴۱(۰/۰۰۰۸۳)	۲/۵۱۷	۱۰
زیرکلاد فارس	۴	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰

میتوکندری. *n*: تعداد افراد؛ *h*: تعداد هاپلوتایپ؛ *Hd*: تنوع هاپلوتایپی؛ *SD*: انحراف معیار؛ *Pi*: تنوع نوکلئوتیدی به‌ازای هر جایگاه؛ *K*: متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی؛ *P*: تعداد جایگاه‌های متغیر.

بحث

سوری ارتباط بسیار نزدیکی را با کلاد ۳a (شامل جمعیت‌هایی از اروپای شرقی، آسیا و آمریکای شمالی) نشان می‌دهند (Murtskhvaladze و همکاران، ۲۰۱۰؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Bouvet و Taberlet، ۱۹۹۴). از سوی دیگر، خرس‌های قهوه‌ای لبنان (نمونه فسیلی) ارتباط نزدیکی را با کلاد ۱ نشان می‌دهند (Taberlet و Bouvet، ۱۹۹۴). به‌هر حال، نمونه فسیلی لبنان اختلاف به نسبت زیادی با سایر هاپلوتایپ‌های کلاد ۱ دارد (Valdiosera و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین، احتمالاً کلاد اروپای غربی در گذشته تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به امروز داشته است. هم‌چنین، به‌نظر می‌رسد این کلاد در گذشته گستره بزرگ‌تری را نسبت به امروز اشغال می‌کرده است. این کلاد از نظر تاریخی در اروپای غربی، آفریقای شمالی و خاورمیانه حضور داشته است (Calvignac و همکاران، ۲۰۰۸).

خرس‌های قهوه‌ای قفقاز (گرجستان)، براساس تحلیل قطعه ۲۷۱ جفت باز، به دو هاپلوگروپ مجزا تقسیم شده و در کلاد ۳a قرار می‌گیرند (Murtskhvaladze و همکاران، ۲۰۱۰). خرس‌های قفقاز، در مقایسه با دیگر توالی‌های متعلق به کلاد ۳a، نزدیک‌ترین رابطه را با خرس‌های خاورمیانه (توالی‌های متعلق به کلاد ۳a) نشان می‌دهند، اگرچه هیچ هاپلوتایپ مشترکی بین آن‌ها وجود ندارد. هم‌چنین، یک پژوهش اخیر در ترکیه (Çilingir و همکاران، ۲۰۱۶) که براساس یک قطعه ۲۶۹ جفت باز از ناحیه کنترل (۳۵ نمونه، ۱۴ هاپلوتایپ) انجام شده است، تنوع قابل توجهی از حضور تبارهای مادری خرس قهوه‌ای را در این کشور تأیید می‌کند. براساس این پژوهش، توالی‌هایی از کلاد ۳a، کلاد ۱ و تبار ایران در ترکیه ثبت شده است (Çilingir و همکاران، ۲۰۰۹).

در آرایه‌شناسی کلاسیک، خرس‌های قهوه‌ای خاورمیانه با ویژگی‌هایی از قبیل اندازه جثه کوچک، دندان‌های آسیای کوچک و بور بودن پوشش بدن و بیش‌تر بر پایه جنبه‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی تنها به‌عنوان یک زیرگونه (*U. arctos syriacus*) شناخته شده است (Kurten، ۱۹۶۵). به‌هر حال، الگوی‌های ژنتیکی ارائه شده توافقی با این توصیف ندارند (Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۶؛ Talbot و Shields، ۱۹۹۶). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که خاورمیانه و شمال آفریقا، از نظر تاریخی موطنی برای چندین کلاد (کلادهای ۵، ۶، شمال آفریقا و ایران) بوده‌اند. روابط این کلادها با سایر خرس‌های قهوه‌ای روشن نشده است (Davison و همکاران، ۲۰۱۱). عدم دسترسی به نمونه‌های کافی از جمعیت‌های خاورمیانه سبب شده است تا تجزیه و تحلیل درستی از موقعیت این جمعیت‌ها در ارتباط با سایر کلادها ممکن نباشد. با این وجود، پژوهش‌های انجام شده به کمک ناحیه کنترل میتوکندری و نیز سیتوکروم *b* برای تعداد اندکی از خرس‌های خاورمیانه (تعداد ۱۰ فرد، توالی‌های کوچک‌تر از ۳۰۰ جفت باز) منجر به شناسایی حداقل شش هاپلوتایپ میتوکندریایی مختلف شده است (Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۶؛ Talbot و Shields، ۱۹۹۶). این یافته‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً جمعیت‌های خرس قهوه‌ای در منطقه خاورمیانه از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار بوده و حداقل به سه کلاد متمایز متعلق‌اند (Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹). براساس بررسی‌ها، برخی نمونه‌های خرس قهوه‌ای

کلادهای خرس قهوه‌ای در جهان مجزا بوده و در یک کلاد جداگانه قرار می‌گیرند. هم‌چنین قابل ذکر است که خرس‌های ایران از خرس‌های قفقاز (Murtskhvaladze و همکاران، ۲۰۱۰)، ترکیه و لبنان (Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۶؛ Talbot و Shields، ۱۹۹۶) در شمال غرب و غرب و خرس‌های پاکستان (Miller و همکاران، ۲۰۰۶) در شرق کشور به‌طور کامل مجزا هستند.

حضور دو یا سه زیرکلاد خرس قهوه‌ای در ایران و به ویژه گستره پراکنش آن‌ها، به یک تمایز گیتاشناختی مشابه آن‌چه که در الگوهای شناخته شده در خرس‌های قهوه‌ای ساکن در آمریکای شمالی، اروپا و آسیا دیده می‌شود، اشاره دارد (Hirata و همکاران، ۲۰۱۳؛ Keis و همکاران، ۲۰۱۳؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Korsten و همکاران، ۲۰۰۹؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۶؛ Kohn و همکاران، ۱۹۹۵؛ Taberlet و Bouvet، ۱۹۹۴؛ Randi و همکاران، ۱۹۹۴) در حال حاضر به‌نظر می‌رسد زیرکلاد فارس به یک گستره گیتاشناختی کوچک واقع در کوه‌های جنوب شرقی زاگرس (مروودشت، امامزاده اسماعیل و اقلید و باغ شادی) محدود شده است، درحالی‌که دو زیرکلاد دیگر (البرز و زاگرس) پراکنش به نسبت گسترده‌تری در ایران دارند.

به‌طور خلاصه، خرس‌های ایران در مقایسه با خرس‌های قهوه‌ای آمریکای شمالی و اروپا (Hirata و همکاران، ۲۰۱۳؛ Keis و همکاران، ۲۰۱۳؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۶؛ Waits و همکاران، ۱۹۹۸) تنوع هاپلوتایپی به نسبت زیادی در توالی ناحیه کنترل میتوکندری نشان می‌دهند. یافته‌های *F_{ST}* و *AMOVA*، وجود ساختار ژنتیکی معنی‌دار بین زیرکلادهای خرس قهوه‌ای در ایران را تأیید می‌نماید. بنابراین، جمعیت‌های امروزی خرس قهوه‌ای در ایران، علاوه بر تنوع هاپلوتایپی به نسبت زیاد، ساختارهای گیتاشناختی مشخصی را نمایش می‌دهند.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران مهندس کاوه خسرویانی و دکتر ندا قوتی سپاسگزاری نمایند. هم‌چنین از همکاری ارزشمند کارشناسان دفتر موزه تاریخ طبیعی و ذخائر ژنتیکی سازمان حفاظت محیط زیست به ویژه مهندس حبیب‌آقا حقی، مهندس راضیه محمدی و مهندس زینب فتح‌الله‌زاده قدردانی می‌شود. این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) و هم‌چنین همکاری سازمان حفاظت محیط زیست به انجام رسیده است که مراتب سپاس و قدردانی به‌عمل می‌آید.

و همکاران، ۲۰۱۵). حضور کلادهای ۱ و ۳a در ترکیه همراه با گزارش نمونه‌هایی از توالی‌های امروزی تبار ایران در خرس‌های ترکیه وجود یک ارتباط پیچیده را در این بخش از گستره پراکنش خرس‌های قهوه‌ای مورد تأیید قرار می‌دهد.

پیش از این، سه نمونه خرس قهوه‌ای (۲۷۱ جفت باز از ناحیه کنترل) متعلق به شمال غرب ایران در تحلیل‌های تبارشناختی استفاده شده‌اند (Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۶). بر پایه تحلیل‌ها، این خرس‌ها در هیچ‌کدام از کلادهای شناسایی شده جای نگرفته و احتمالاً یک کلاد متمایز از دیگر کلادهای خاورمیانه تشکیل می‌دهند (Davison و همکاران، ۲۰۱۱؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۶). علاوه بر این، انتظار می‌رود خرس‌های ایران از تنوع ژنتیکی قابل توجهی برخوردار هستند، چرا که مطالعه سه نمونه از خرس‌های ایران، منجر به کشف سه هاپلوتایپ جدید شده است (Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹). در مجموع، همه پژوهش‌های پیشین بر این نکته اتفاق نظر دارند که در حال حاضر نمی‌توان جایگاه مشخصی برای خرس قهوه‌ای ایران اعلام نمود و نمونه‌برداری و انجام بررسی‌های گسترده در این زمینه، ضروری است (Davison و همکاران، ۲۰۱۱؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۸؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۶).

در این پژوهش، ۵۰ نمونه خرس قهوه‌ای از ایران براساس یک قطعه ۶۱۴ جفت باز از ناحیه کنترل میتوکندری توالی‌یابی شد. یافته‌های حاصل از تحلیل‌های بیشینه احتمال و بیزین به‌طور مشابه و با ارزش‌های بوت‌استرپ و احتمال پسین بالا خرس‌های قهوه‌ای ایران را در یک تبار کاملاً مجزا از کلادهای جهانی خرس قهوه‌ای قرار دادند. خرس‌های ایران جدا از سایر کلادهای شناخته شده به سه زیرکلاد مجزا شامل: (۱) زیرکلاد البرز (۳۰ نمونه، ۱۴ هاپلوتایپ)، (۲) زیرکلاد زاگرس (۱۶ نمونه، هفت هاپلوتایپ) و (۳) زیرکلاد فارس در جنوب شرقی زاگرس (۴ نمونه، یک هاپلوتایپ) تقسیم شدند. در این تحلیل تمامی خرس‌های قهوه‌ای ساکن البرز تا ارسباران در اولین زیرکلاد (البرز) قرار گرفتند. گستره گیتاشناختی دومین زیرکلاد (زاگرس)، به‌طور پیوسته دربرگیرنده تمامی خرس‌های قهوه‌ای از سه‌سند (آذربایجان شرقی) تا تکاب و از آن‌جا تا کردستان، کرمانشاه، ایلام، لرستان، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، کهگیلویه و بویراحمد، خوزستان و کازرون (در استان فارس) است. چهار نمونه در محدوده مروودشت و امامزاده اسماعیل (استان فارس) زیرکلاد سوم را تشکیل دادند.

یافته‌های این مطالعه موافق با پیش‌بینی‌های سایر پژوهش‌ها (Davison و همکاران، ۲۰۱۱؛ Calvignac و همکاران، ۲۰۰۹؛ Galbreath و همکاران، ۲۰۰۷؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۶) بر این نکته تأکید دارد که خرس‌های قهوه‌ای ایران از تمامی



منابع

- United States and Mexico. *Molecular Ecology*. Vol. 15, pp: 4477-4485.
۱۹. **Murtskhvaladze, M.; Gavashelishvili, A. and Tarkhishvili, D., 2010.** Geographic and genetic boundaries of brown bear (*Ursus arctos*) population in the Caucasus. *Molecular Ecology*. Vol. 19, pp: 1829-1841.
 ۲۰. **Paetkau, D.; Waits, L.P.; Clarkson, P.L.; et al., 1998.** Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conservation Biology*. Vol. 12, pp: 418-429.
 ۲۱. **Randi, E.; Gentile, L.; Boscagli, G.; Huber, D. and Roth, H.U., 1994.** Mitochondrial DNA sequence divergence among some west European brown bear (*Ursus arctos* L.) populations. Lessons for conservation. *Journal of Heredity*. Vol. 73, pp: 480-489.
 ۲۲. **Ridings, C., 2006.** Green bear in the desert. *International Bear News*. Vol. 15, pp: 12-13.
 ۲۳. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. Vol. 19, pp: 1572-1574.
 ۲۴. **Servheen, C., 1990.** The status and conservation of the bears of the world. *International Association for Bear Research and Management Monograph Series No. 2*.
 ۲۵. **Servheen, C.; Herrero, S. and Peyton, B., 1999.** Bears: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland. 320 p.
 ۲۶. **Stamatakis, R., 2014.** RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*.
 ۲۷. **Swenson, J.E.; Taberlet, P. and Bellemain, E., 2011.** Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos*. *Mammal Review*. Vol. 41, pp: 87-98.
 ۲۸. **Taberlet, P. and Bouvet, J., 1994.** Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Vol. 255, pp: 195-200.
 ۲۹. **Talbot, S.L. and Shields, G.F., 1996.** Phylogeography of brown bears (*Ursus arctos*) of Alaska and paraphyly within the Ursidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 5, pp: 477-494.
 ۳۰. **Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipiński, A. and Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 30, pp: 2725-2729.
 ۳۱. **Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994.** ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22, pp: 4673-4680.
 ۳۲. **Valdiosera, C.; Garcia, N.; Anderung, C.; Dalen, L.; Cregut-Bonnouere, E.; Kahlke, R.D.; Stiller, M.; Brandström, M.; Thomas, M.G.; Arsuaga, J.; Götherström, A. and Barnes, I., 2007.** Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Molecular Ecology*. Vol. 16, pp: 5140-5148.
 ۳۳. **Waits, L.P.; Talbot, S.; Ward, R. and Shields, G.F., 1998.** Mitochondrial DNA phylogeography of the north American brown bear and implications for conservation. *Conservation Biology*. Vol. 12, pp: 408-417.
 ۳۴. **Weir, B.S. and Cockerham, C.C., 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution*. Vol. 38, pp: 1358-1370.
 ۳۵. **Zedrosser, A.; Dahle, B.; Swenson, J. and Gerstl, N., 2001.** Status and management of the brown bear in Europe. *Ursus*. Vol. 12, pp: 9-20.
 ۱. **Bandelt, H.J.; Forster, P. and Röhl, A., 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 16, pp: 37-48.
 ۲. **Boitani, L.; Jdeidi, T.; Masseti, M.; de Smet, K. and Cuzin, F., 2008.** *Ursus arctos*. IUCN Red List of Threatened Species, Version 2009.1. **Calvignac, S.; Hughes, S.; Tougaard, C.; Michaux, J.; Thevenot, M.; Philippe, M.; Hamdine, W. and Hänni, C., 2008.** Ancient DNA evidence for the loss of a highly divergent brown bear clade during historical times. *Molecular Ecology*. Vol. 17, pp: 1962-1970.
 ۳. **Calvignac, S.; Hughes, S. and Hänni, C., 2009.** Genetic diversity of endangered brown bear (*Ursus arctos*) populations at the cross roads of Europe, Asia and Africa. *Diversity and Distributions*. Vol. 15, pp: 742-750.
 ۴. **Can, O. and Togan, I., 2004.** Status and management of brown bears in Turkey. *Ursus* 15, pp: 48-53.
 ۵. **Cilingir, F.G.; Peksen, C.A.; Ambarli, H.; Beerli, P. and Bilgin, C.C., 2015.** Exceptional maternal lineage diversity in brown bears (*Ursus arctos*) from Turkey. *Zoological Journal of the Linnean Society*. doi: 10.1111/zoj.12322.
 ۶. **Davison, J.; Ho, S.Y.W.; Bray, S.C.; Korsten, M.; Tammeleht, E.; Hindrikson, M.; Østbye, K.; Østbye, E.; Lauritzen, S.E.; Cooper, A. and Saarma, U., 2011.** Late Quaternary biogeographic scenarios for the brown bear (*Ursus arctos*), a wild mammal model species. *Quaternary Science Reviews*. Vol. 30, pp: 418-430.
 ۷. **Excoffier, L. and Lischer, H.E.L., 2010.** Arlequin suite ver ۳.۰: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. Vol. 10, pp: 564-567.
 ۸. **Galbreath, G.J.; Groves, C.P. and Waits, L.P., 2007.** Genetic resolution of composition and phylogenetic placement of the Isabelline Bear. *Ursus*. Vol. 18, pp: 129-131.
 ۹. **Hailer, F.; Kutschera, V.E.; Hallstrom, B.M.; Klassert, D.; Fain S.R.; Arnason, U. and Janke, A., 2012.** Nuclear genomic sequences reveal that polar bears are an old and distinct bear lineage. *Science*. Vol. 336, pp: 344-347.
 ۱۰. **Hirata, D.; Mano, T.; Abramov, A.V.; Baryshnikov, G.F. and Kosintsev, P.A., 2013.** Molecular phylogeography of the brown bear (*Ursus arctos*) in northeastern Asia based on analyses of complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 30, pp: 1644-1652.
 ۱۱. **Keis, M., 2013.** Brown bear (*Ursus arctos*) phylogeography in northern Eurasia. PhD Thesis. Department of Zoology, Faculty of Science and Technology, University of Tartu, Estonia. 65 p.
 ۱۲. **Keis, M.; Remm, J.; Ho, S.Y.W.; Davison, J.; Tammeleht, E.; Tumanov, I.L.; et al., 2013.** Complete mitochondrial genomes and a novel spatial genetic method reveal cryptic phylo geographical structure and migration patterns among brown bears in north-western Eurasia *Journal of Biogeography*. Vol. 40, pp: 915-927.
 ۱۳. **Kohn, M.; Knauer, F.; Stoffella, A.; Schroder, W. and Paabo, S., 1995.** Conservation genetics of the European brown bear using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology*. Vol. 4, pp: 95-103.
 ۱۴. **Korsten, M.; Ho, S.Y.W.; Davison, J.; Pahn, B.; Vulla, E. and Roht, M., 2009.** Sudden expansion of a single brown bear maternal lineage across northern continental Eurasia after the last ice age: a general demographic model for mammals? *Mol Ecol*. Vol. 18, pp: 1963-1979.
 ۱۵. **Lanfear, R.; Calcott, B.; Ho, S.Y. and Guindon, S., 2012.** PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 29, pp: 1695-1701.
 ۱۶. **Lanfear, R.; Calcott, B.; Kainer, D.; Mayer, C. and Stamatakis, A., 2014.** Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. *BMC Evolutionary Biology*. Vol. 14, 82 p.
 ۱۷. **Librado, P. and Rozas, J., 2009.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. Vol. 25, pp: 1451-1452.
 ۱۸. **Miller, C.R.; Waits, L.P. and Joyce, P., 2006.** Phylogeography and mitochondrial diversity of extirpated brown bear (*Ursus arctos*) populations in the contiguous

